

UNTERSUCHUNGEN ZUR
BEDEUTUNG DER GLUCOSEOXIDATION
FÜR DIE GLUCOSEINDUZIERT SEKRETION
DES INSULINS
AUS ISOLIERTEN LANGERHANSschen INSELN

Petro E. Petrides

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus der biochemischen Abteilung der Forschergruppe Diabetes
München (Leitung: Prof.Dr.med.O.H.Wieland)

U N T E R S U C H U N G E N Z U R B E D E U T U N G
D E R G L U C O S E O X I D A T I O N F Ü R D I E
G L U C O S E I N D U Z I E R T E S E K R E T I O N
D E S I N S U L I N S A U S I S O L I E R T E N
L A N G E R H A N S ' S C H E N I N S E L N

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Petro E. Petrides

aus Berlin

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. Otto H. Wieland

Mitberichterstatter: Prof.Dr.rer.nat. Hans Fritz

Dekan: Prof.Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.1977



Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1

Bedeutung von Glucose als Brenn- und Baustoff
im Zellstoffwechsel des tierischen Organismus

Insulin als Hormon des Kohlenhydratstoffwechsels

Regulation des Blutglucosespiegels im peripheren
Blut

Biosynthese und Sekretion des Insulins

Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit

Bedeutung der Untersuchungen

II. Methodik

11

Chemikalien für Inselpräparation, Inkubation
und CO_2 -Bestimmung

Chemikalien für die Insulinbestimmung

Versuchstiere

Präparation der Inseln

Inkubation zur Bestimmung der Insulinsekretion

Inkubation zur Bestimmung der Glucoseoxidation
und -aufnahme

Bestimmung des Insulins

Bestimmung des Protein- und Nucleinsäuregehaltes
von Inseln

III. Ergebnisse

22

Inselpräparation

Insulinsekretion in Abhängigkeit vom Glucoseange-
bot im Inkubationsmedium

Glucoseoxidation und -aufnahme in Abhängigkeit vom
Glucoseangebot im Inkubationsmedium

Einfluß von Theophyllin und db-cAMP auf die Insulin-
sekretion

Einfluß von Theophyllin und db-cAMP auf die Glucose-
oxidation

Einfluß von Glibenclamid und Diazoxid auf die gluco-
seinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation

Einfluß von Hemmstoffen der Glykolyse und der mito-
chondrialen Oxidation auf die glucoseinduzierte In-
sulinsekretion und Glucoseoxidation

Probleme bei der Inselpräparation

Methoden zum Studium Langerhans'scher Inseln

Intaktheit unserer Inselpräparationen

Bedeutung der Glucoseoxidation für die
glucoseinduzierte Insulinsekretion

Bedeutung des Pentosephosphatweges für die
glucoseinduzierte Insulinsekretion

Einfluß von Effektoren der glucoseinduzierten
Insulinsekretion auf die Glucose-
oxidation

Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf die
Insulinsekretion und Glucoseoxidation

Metabolit- versus Receptorhypothese

V. Zusammenfassung

67

VI. Literaturverzeichnis

69

VII. Danksagungen

80

VIII. Lebenslauf

81

I. Einleitung

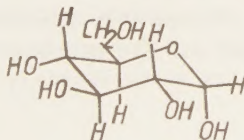
"Indeed, any young scientist with the intention of working in this field will probably get confused when first confronted with the literature, and unless he is totally unconscious or extremely self-confident, will seek some other topic of inquiry, where simpler questions may be given simpler answers."

So leitete Erol Cerasi (Stockholm) einen im Jahre 1974 in Jerusalem gehaltenen Vortrag über seine Untersuchungen zur Insulinsekretion ein (Cerasi, 1975). Die Weiterentwicklung der Methodik, insbesondere die Entwicklung spezifischer radioimmunologischer Bestimmungsverfahren für extrem geringe Mengen von Insulin und anderen Proteohormonen wie z.B. Glukagon und die Möglichkeit, das Pankreas oder sogar Langerhans'sche Inseln isoliert zu untersuchen, haben eine Flut von Ergebnissen zum Mechanismus der Insulinsekretion hervorgerufen. Diese Forschungen haben eine Fülle einzelner Mosaiksteinchen geliefert, die sich bisher jedoch nur schwer zu einem Gesamtbild zusammenfügen lassen.

Bedeutung von Glucose als Brenn- und Baustoff im Zellstoffwechsel des tierischen Organismus

Glucose, eine Hexose (Abb.I-1), stellt ein wichtiges Biomolekül für den Stoffwechsel fast aller Gewebe des menschlichen Organismus dar. Es kann von diesen als Brennstoff zur Energiegewinnung verwertet werden oder als Baustoff Verwendung finden.

Abb.I-1 . Cyclische Struktur
der β -D-Glucose



Dabei dient es z.B. als Vorstufe von Fruktose, Galaktose, Glucuronat, Mannose und Fucose bzw. deren Derivaten, die ihrerseits Bestandteile zahlreicher Bausteine der Zelle und des Zwischenzellgewebes darstellen. Außerdem geht von Glucose die Biosynthese derjenigen Aminosäuren aus, die im Stoffwechsel der tierischen Zelle noch synthetisiert werden. Auch Fettsäuren können aus Glucose gebildet werden. Als Brennstoff ist Glucose für verschiedene Gewebe wie das Gehirn, das Rückenmark, Erythrocyten, Nierenmark usw. unentbehrlich. Diese Gewebe müssen deshalb ständig mit Glucose versorgt werden. Da aber der Mensch zu den periodischen Essern zählt, muß die zu den Mahlzeiten zugeführte Glucose auch in Depots gespeichert werden können, aus denen sie bei Bedarf jederzeit zur Versorgung der glucoseabhängigen Gewebe freigesetzt wird. Dazu dient das Glykogen, ein Glucosylpolymer, das sich vorwiegend in der Leberzelle, aber z.B. auch in der Muskel-, Nerven- und β -Zelle der Langerhans'schen Inseln des Pankreas findet.

Die mit den täglichen Mahlzeiten hauptsächlich in Form von Stärke und Glykogen zugeführte Glucose gelangt nach Resorption über die Pfortader in die Leber. Dort wird - je nach Höhe des Angebots - etwa 70% retiniert (Cerasi, 1975), der Rest gelangt in den großen Kreislauf und damit in alle peripheren Organe. Durch die Aufnahme des Glucosemoleküls in die Hepatocyten wird die Überschwemmung des Systemkreislaufes mit dieser Hexose und damit eine Überschreitung der Nierenschwelle verhindert. Der in den großen Kreislauf gelangte Zucker tritt nun nicht einfach nach Überschreiten der Endothelschranke aus dem interstitiellen Raum in die Gewebszellen über (durch Diffusion oder andere Transportvorgänge), sondern nur in die, die für Glucose frei permeabel sind. Dazu gehören neben der Leberzelle auch die Erythrocyten, die Serosamembran der Darmschleimhautzellen, Nervenzellen, Blutgefäße, Inselzellen des Pankreas, die Linse des Auges und die Nierenzellen.

Insulin als Hormon des Kohlenhydratstoffwechsels

In die übrigen Gewebe (Herz- und Skelettmuskel, Fettgewebe, laktierende Brustdrüse, Samenblasen, Knochen und Knorpel, Haut und Aorta) gelangt Glucose nur sehr langsam oder schneller in Gegenwart von Insulin, einem in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildeten Proteohormon. Insulin gilt zwar allgemein als das Hormon des Kohlenhydratstoffwechsels, reguliert jedoch auch Lipid- und Proteinstoffwechsel.

Das aus dem Pankreas secernierte Insulin gelangt zuerst in die Leber; es hat dort zwar keinen Einfluß auf den Glucosetransport, reguliert den intracellulären Glucosestoffwechsel aber durch Derepression der Schlüsselenzyme der Glykolyse und gleichzeitige Repression der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese. Ebenso aktiviert es die Glykogen-Synthetase und inaktiviert gleichzeitig die Glykogen-Phosphorylase. Außerdem fördert Insulin die Lipogenese aus Kohlenhydraten und hemmt die Ketogenese. Auf den Aminosäure- und Proteinstoffwechsel des Hepatocyten wirkt Insulin durch eine Förderung des Einbaues von Aminosäuren in Proteine, eine Hemmung der Freisetzung von Aminosäuren und eine Hemmung der Harnstoffbiosynthese (Übersicht bei Löffler und Weiss, 1975).

An Muskel- und Fettzelle - die von den insulinempfindlichen Geweben bisher am intensivsten untersucht worden sind - steigert Insulin - wie oben schon erwähnt - den transmembranären Glucosetransport. In diesen beiden Geweben stellt die Glucoseaufnahme den begrenzenden Schritt des Glucosestoffwechsels dar. Eine Förderung dieses Prozesses wirkt sich in einer Steigerung des Gesamtglucoseumsatzes aus und kann unter Berücksichtigung des großen Anteils dieser Gewebe an der gesamten Körpermasse den prompten Abfall des Blutzuckerspiegels nach Erhöhung des Insulinspiegels erklären. Außerdem wirkt Insulin proteinanabol und fördert die Glykogenbildung im Muskulocyten und die Triglyceridsynthese im Adipocyten.

Insulin ist damit ein anaboles Hormon, das bei Nahrungszufuhr die Aufnahme der Nährstoffe in die einzelnen Depots reguliert: die Speicherung von Glucose als Glykogen in der Leber, von Fettsäuren als Triglyceriden im Fettgewebe und von Aminosäuren in Proteinen des Muskelgewebes.

Regulation des Blutglucosespiegels im peripheren Blut

Die Höhe des Blutglucosespiegels ist die Resultante aus glucoseverbrauchenden und -liefernden Prozessen. Die ersten Reaktionen sind Prozesse, die Energie verbrauchen wie die Muskelarbeit oder Stoffwechselschritte, bei denen Glucose in die Synthese anderer Stoffe einfließt, die letzteren Reaktionen sind die Kohlenhydratzufuhr mit der Nahrung und die Glucosebildung aus endogenen Vorstufen. Unterläge die Blutglucosekonzentration keiner hormonalen Regulation, so würden die Blutglucosewerte in Abhängigkeit von der Nahrungszufuhr und körperlicher Tätigkeit zwischen extrem hohen und niedrigen Werten schwanken. Tatsächlich ist jedoch das in Abb.I-2 gezeigte Blutglucoseprofil vorhanden, d.h. die Blutglucosekonzentration schwankt normalerweise nur zwischen etwa 55 und 130 mg/100ml (3,1 und 7,2 mMol/Liter), da sie der hormonalen Regulation durch Insulin, aber auch durch Glucagon und Katecholamine unterworfen ist.

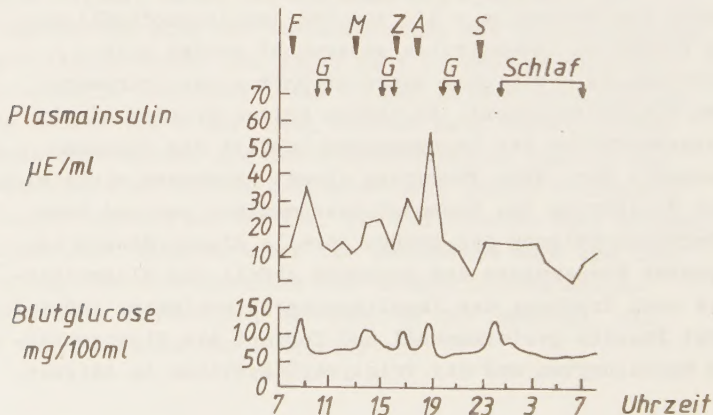


Abb.I-2. 24-Stundenprofil von Plasmainsulin und Blutglucose bei einer normalgewichtigen Versuchsperson. F= Frühstück, M=Mittagessen, Z=Zwischenmahlzeit, A=Abendessen, S=Spätmahlzeit, G= eine Stunde gehen (nach Molnar et al., 1972)

Gelangt nach Nahrungszufuhr Blut mit einem erhöhten Glucosegehalt über die Art.mes.sup. und Äste des Truncus coeliacus zu den Inselzellen des Pankreas, so reagieren diese mit einer vermehrten Insulinausschüttung. Diese Beobachtung haben Grafe und Meythaler schon vor einem halben Jahrhundert gemacht, weshalb sie Glucose "als Hormon für die Insulinabgabe" bezeichneten (Grafe und Meythaler, 1927, 1928).

Das freigesetzte Insulin verläßt das Pankreas über die Pankreasvenen, die in die Pfortader münden, und gelangt somit zuerst in die Leber. Dort führt es über die besprochenen Mechanismen zu einer vermehrten Glucosespeicherung. Etwa 20 bis 50% des freigesetzten Insulins passiert das Lebergefäßsystem, erreicht den peripheren Kreislauf und entfaltet seine Wirkung an insulinempfindlichen peripheren Organen. Resultat dieses Anstiegs des Insulinspiegels ist ein Abfall des Glucosespiegels, wie die kontinuierliche Messung zeigt (Abb.I-2, S.4). Daß der Blutzuckerspiegel durch diese Regulation nicht unter kritische Werte (50 mg/100ml bzw. 2,8 mMol/Liter) fällt, wird durch eine Gegenregulation durch Glukagon, einem weiteren Pankreashormon und die Katecholamine erreicht, die bei einem Absinken des Blutglucosespiegels vermehrt ins Blut freigesetzt werden und an der Leberzelle zu einer vermehrten Glucosefreisetzung führen. Diese Gegenregulation ist in Abb.I-2 daran zu erkennen, daß der Blutzuckerspiegel nach Erreichen eines Minimumwertes auch ohne exogene Zufuhr wieder leicht ansteigt.

Biosynthese und Sekretion des Insulins

Insulin gehört zur Gruppe der Proteohormone. Es besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren, die in zwei Ketten (A- und B-Kette) - verbunden durch zwei Disulfidbrücken - angeordnet sind.

Durch Röntgenstrukturanalyse konnte auch die Konformation des Insulinmoleküls aufgeklärt werden (Abb.I-3, S.6).

In der β -Zelle wird Insulin in Form einer Vorstufe, des Proinsulins, an den Polyribosomen des endoplasmatischen Retikulums gebildet und anschließend in Vesikeln, den sog. β -Granula, verpackt. Die Umwandlung von Proinsulin in Insulin erfolgt durch Abspaltung eines C-Peptides (Proteinmodifikation).



Abb. 1-3 . Ball and Stick-Modell der räumlichen Struktur des Insulins. Die hellen Anteile stellen das Grundgerüst der Ketten dar, die dunklen Anteile die Seitenketten (Aufnahme freundlichst überlassen von H.Geiger, Farbwerke Hoechst).

Neuere Befunde deuten auf die Existenz einer weiteren Vorstufe, des sog. Präproinsulins, hin (Steiner, 1976). Dabei handelt es sich um ein Proteinmolekül, das am N-terminalen Ende zusätzlich 23 Aminosäuren aufweist. Nach einer Hypothese von Blobel und Dobberstein (1975) besitzen alle von Zellen secernierten Proteine - zu denen auch Insulin zählt - mRibo-nucleinsäuren mit einem zusätzlichen Code für ein gemeinsames Peptid, das sog. Signalpeptid. Das Signalpeptid soll nur in der wachsenden Proteinkette vorhanden sein und eine kurze Halbwertszeit besitzen. Es soll - wie Abb.I-4 zeigt - von der großen Untereinheit des Ribosoms aus in die Membran des endoplasmatischen Retikulums eindringen und dadurch die Aggregation verschiedener ribosomaler Receptorproteine der ER-Membran zur Bildung eines Tunnels durch die Membran induzieren.

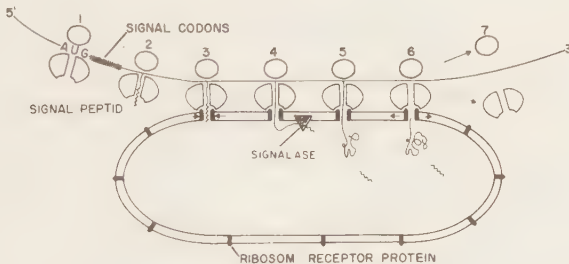


Abb.I-4 . Schematische Darstellung der Translation der mRNA für secernierte Proteine an membrangebundenen Ribosomen und des Transfers der Translationsprodukte durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Vortrag G.Blobel FEBS Advanced Course No.43, London 1976)

Der neugebildete Tunnel in der Membran tritt nun mit den Tunnel in der großen Untereinheit des Ribosoms so in Wechselwirkung, daß das Signalpeptid und die wachsende Peptidkette durch die Membran in den intracisternalen Raum gelangen können. Anschließend wird das Signalpeptid durch das membranständige Enzym Signalase von der wachsenden Peptidkette abgespalten.

Nach Freisetzung der fertiggestellten Peptidkette vom Ribosom wird das Ribosom unter Auflösung des Membran-tunnels wieder vom endoplasmatischen Retikulum gelöst.

Aus dem rauhen endoplasmatischen Retikulum schnüren sich Mikrovesikel ab, die in die Golgi-Region gelangen (Abb.I-5). Hier und in vom Golgi-Apparat abspressenden Frühformen von β -Granula wird Proinsulin in Insulin umgewandelt. Die reifen β -Granula wandern bei einem Sekretionsreiz an die Innenoberfläche der Zellmembran, fusionieren mit dieser, wobei sich der Zellinhalt in den interstitiellen Raum ergießt. Es vergeht etwa eine Stunde, bis neusynthetisiertes Insulin secerniert wird.



Abb.I-5 . Zeitlicher Ablauf und mögliche Mechanismen bei der Biosynthese und Sekretion von Insulin in der β -Zelle. R.E.R.: rauhes endoplasmatisches Retikulum, M.V.: Mikrovesikel (nach Steiner et al., 1974).

Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, wie die β -Zelle der Langerhans'schen Insel die Information einer veränderten Glucosekonzentration im extracellulären Raum aufnimmt und in den Sekretionsvorgang umsetzt.

Obwohl neben Glucose eine Reihe anderer Substrate die Insulinsekretion beeinflussen, haben wir uns in diesen Studien auf das Glucosemolekül und die damit verbundenen Überlegungen beschränkt. Die Beschränkung auf das Glucosemolekül erfolgt auch deshalb, weil in allen Stadien des Diabetes mellitus die Verteilung der Glucose bei einer normierten Glucosebelastung im Organismus verändert ist. Dies ist - wie Abb.I-6 zeigt - auf eine Reduktion der Insulinsekretion zurückzuführen.

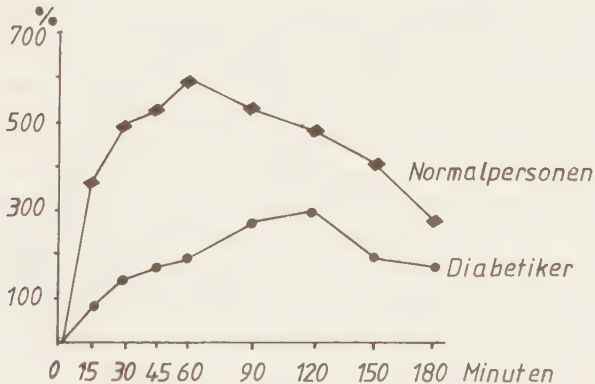


Abb.I-6. Verhalten des Seruminsulins nach oraler Glucosebelastung mit 100g bei idealgewichtigen Normalpersonen und Diabetikern (Prozentuale Veränderung gegenüber den Nüchternwerten)(nach Bagdade et al., 1967).

Da der Insulingehalt der Inseln bei diesen Patienten selbst nicht verändert ist, muß eine Störung der Informationsverarbeitung durch die β -Zelle vorliegen. Das heißt, die β -Zelle ist in ihrer Funktion beeinträchtigt, eine Änderung der Glucosekonzentration zu erkennen und auf diese mit einer vermehrten Insulinabgabe zu reagieren.

Außerdem reagieren die Pankreata vieler Diabetiker auf andere sekretionsauslösende Moleküle wie Tolbutamid, Arginin oder Isoproterenol, so daß man einen funktionellen Defekt der Unempfindlichkeit vermutet hat.

Als Erklärungsmöglichkeiten für den Prozess der glucoseinduzierten Insulinsekretion unter physiologischen, d.h. nicht-diabetischen Bedingungen stehen derzeit folgende Hypothesen zur Diskussion:

- (a) das Glucosemolekül tritt in die β -Zelle ein und wird dort abgebaut, wobei ein - oder auch mehrere - Abbauprodukt(e) den Sekretionsprozess in Gang setzen (Metabolithypothese)
- (b) die Glucose gelangt an die β -Zelloberfläche, an der sich ein spezifisches Receptorprotein befindet, dessen Besetzung mit dem Glucosemolekül die Sekretion über zwischengekoppelte Mechanismen - wie z.B. eine Änderung des transmembranären Natrium- oder Calciumstromes oder der intracellulären Cyclo-AMP-Konzentration - auslöst (Receptorhypothese).

Auch im ersten Fall tritt ein Protein, d.h. das Transportsystem für Glucose (Hellerström und Brolin, 1975) oder das Enzymprotein, das Glucose in Glucose-6-Phosphat überführt, als "Glucoreceptor" mit dem Glucosemolekül in Wechselwirkung, löst aber dadurch nicht die Sekretion aus.

In dieser Arbeit soll die Beeinflussung der Glucoseoxidation isolierter Langerhans'scher Inseln durch verschiedene Effektoren untersucht werden, um aus den Ergebnissen Schlüsse über die Bedeutung des Abbaufweges für den Sekretionsvorgang ziehen zu können.

Bedeutung der Untersuchungen

Die Bedeutung der Untersuchungen liegt zum einen in der Häufigkeit des Diabetes mellitus, der durch Veränderungen des Glucosestoffwechsels mit resultierender Hyperglykämie und dem Auftreten chronischer Komplikationen gekennzeichnet ist (Spiro, 1976). Etwa 2% der Gesamtbevölkerung leiden an einem relativen oder absoluten Insulinmangel, sind also diabetisch. Zum anderen können die Studien zur Beantwortung der Frage herangezogen werden, wie Biosysteme Informationen verarbeiten, d.h. wie z.B. Veränderungen der Molekülkonzentration von Zellen erkannt und in Arbeit wie z.B. die Sekretion eines Proteins umgesetzt werden.

II. Methodik

Chemikalien für Inselpräparation, Inkubation und CO_2 -Bestimmung

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB-Puffer nach Krebs und Henseleit, 1932):

Lösung 1:	0,90 % NaCl	(0,154 M)
Lösung 2:	1,15 % KCl	(0,154 M)
Lösung 3:	1,22 % CaCl_2	(0,110 M)
Lösung 4:	2,11 % KH_2PO_4	(0,154 M)
Lösung 5:	3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	(0,154 M)
Lösung 6:	1,30 % NaHCO_3	(0,154 M)

Die Natriumhydrogencarbonat-Lösung wird eine Stunde mit CO_2 begast. Die Lösungen sind die Stammlösungen des KRB-Puffers. Sie sind verschlossen bei 4°C aufzubewahren.

100 Teile Lösung 1, 4 Teile Lösung 2, 3 Teile Lösung 3 und jeweils 1 Teil Lösung 4 und 5 werden gemischt; zu 84 ml dieser Mischung werden 16 ml von Lösung 6 zugegeben und kühl aufbewahrt.

Die Endkonzentration der einzelnen Elektrolyte beträgt: Natrium 142,25 mMol/Liter, Kalium 5,88 mMol/Liter, Calcium 2,5 mMol/Liter, Magnesium 1,2 mMol/Liter, Chlorid 128 mMol/liter, Phosphat und Sulfat je 1,2 mMol/Liter und Bicarbonat 25 mMol/Liter.

Albumin: Rinder-Serum-Albumin reinst (Behring-Werke, Marburg)

KRB-Albumin-Puffer: Serumalbumin wird in KRB-Puffer gelöst (4g in 20ml Puffer). Die Lösung wird über Nacht im Kälteraum gegen die etwa 1000fache Menge KRB-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse werden die Albuminproben in 4g-Portionen eingefroren. Zum Gebrauch werden jeweils 4g Albumin mit KRB-Puffer auf 100ml verdünnt. Diese Lösung wird 10 Minuten mit 95% O_2 und 5% CO_2 begast. Der KRB-Albuminpuffer muß verschlossen aufbewahrt werden (pH-Wert $7,4 \pm 0,1$).

Inkubationspuffer: KRB-Puffer, der zusätzlich 10 mM Pyruvat, 10 mM Glutamat, 2,8 mM Glucose und 0,5g/100ml Albumin enthält.

Trasyolol: in 5ml Ampullen, die 100 000 KIE (Kallikrein-Inaktivator-Einheiten) in steriler isotonischer Lösung enthalten (Bayer, Leverkusen).

D- (+)-Glucose: wasserfrei, p.A. (Merck, Darmstadt)

Glutamat-Natrium: p.A. (Merck, Darmstadt)

Pyruvat-Natrium: p.A. (Merck, Darmstadt)

Collagenase: CLS 2 BC 200 U/mg (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, N.J., USA) oder lyophilisiert 155 PZ - U/g (ca. 387 Mandl Einheiten/mg) (Serva Biochemica, Heidelberg) oder Collagenase der Fa.Boehringer, Mannheim.
Die Collagenase-Chargen müssen bei 4° C aufbewahrt werden.

(1-¹⁴C)-Glucose, (6-¹⁴C)-Glucose: spezifische Aktivität 16,5 µC/mg (Radiochemical Centre, Amersham, England)

(U-¹⁴C)-Glucose: spezifische Aktivität 200 - 300 µC/µMol (Radiochemical Centre, Amersham, England)

B-Phenyläthylamin: (25% in Methanol) (Fluka, Buchs, Schweiz)

8 N Schwefelsäure: (Merck, Darmstadt)

Scintillations-Lösung: 2,5-Diphenyloxazol (PPO 5,0 g) und 1,4-Bis-(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP 0,5 g) werden in Toluol auf 1 Liter gelöst (Packard, Frankfurt/Main)

Chromatographiepapier: Whatman Nr.3 oder Schleicher und Schüll, Dassel 2043 b

Natriumfluorid: p.A. (Merck, Darmstadt)

Jodacetat: p.A. (Sigma Chemicals)

Theophyllin: (Serva, Heidelberg)

Dibutyryl-Cyclo-AMP: (Boehringer, Mannheim)

Glibenclamid: (Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main)

Diazoxid: (Byk-Essex, München)

Chemikalien für die Insulinbestimmung

Insulinantikörper: Entweder durch Immunisierung von Meerschweinchen oder kommerzielle Meerschweinchen-Antiinsulinsera gegen Rinder- bzw. Schweineinsulin (z.B.Eli Lilly, Indianapolis)

Radioinsulin: ¹²⁵Jod markiertes Insulin (Novo Industrie, Kopenhagen)

Standardinsulin: kristallisiertes Insulin, das frei von C-Peptid, Proinsulin und anderen Spaltprodukten des Insulins ist (z.B. Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main)

Lösungen: Puffer I: Barbitat-Natrium-Puffer 60 mM, pH 7,4, in 0,85%iger NaCl. Als Zusatz Natriumazid 1 g/Liter (p.A., Merck, Darmstadt)

Puffer II: wie I, jedoch mit Rinder-Serum-Albumin (Serva, Heidelberg) 5 g/Liter

Radio-Jod-Insulin: ^{125}J -Insulin wird in Albuminpuffer je nach spezifischer Aktivität bis zu einer Konzentration von 20 - 50 $\mu\text{E/ml}$ verdünnt.

Antikörperversdünnung: Die für die Bestimmung notwendigen Verdünnungen des im allgemeinen lyophilisierten oder tiefgefrorenen Antikörpers werden mit Puffer II durchgeführt.

Insulinstandardlösung: 50E Human- oder Schweineinsulin werden in 1 ml 0,03 N HCL gelöst. Diese Stammlösung ist tiefgefroren über Monate haltbar. Durch Verdünnung mit Puffer II wird eine Insulinstandardlösung hergestellt, die 400 μE pro ml enthält und aus der die weiteren für die Eichkurve benötigten Verdünnungen bereitet werden.

Kohle-Dextran-Gemisch: 12,5 g Aktiv-Kohle (Norit A, Partikelgröße 4-5 μ , Serva, Heidelberg) werden in 250 ml Puffer I suspendiert. 1,25 g Dextran (Molekulargewicht 80 000, Pharmacia, Frankfurt) werden in 250 ml Puffer I gelöst und unter Rühren zur Kohlesuspension zugegeben. Die Suspension soll einen pH-Wert von 7,4 bis 7,6 haben, andernfalls ist der pH einzustellen. Einige Chargen von Aktivkohle enthalten alkalische Verunreinigungen und zeigen in diesen Fällen pH-Werte um 9. Sie sind für Insulinbestimmungen nicht geeignet.

Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten (Fa. Thomae, Biberach/Riss) mit einem Gewicht von etwa 200g sowie Swiss-Mäuse (Tierzuchtung Mus-Rattus) mit einem Gewicht von 20 bis 40g verwendet. Die Tiere wurden mit einer Standardnahrung ad libitum gefüttert.

Präparation der Inseln

Die Inselpräparation stellt eine Modifikation der ursprünglich von Moskalewski (1965) sowie Kostianowski und Lacy (1966) und Lacy und Kostianowski (1967) beschriebenen Methode dar. Die Versuchstiere werden durch Decapitation ad exitum gebracht. Anschließend erfolgt die Eröffnung des Abdomens und Darstellung des Leberhilus. Ratten und Mäuse weisen einige anatomische Unterschiede auf: u.a. ist der Darm bei der Maus erheblich länger, alte Mäuse enthalten wesentlich mehr Fettgewebe als alte Ratten, die Maus hat im Gegensatz zur Ratte eine Gallenblase (Abb.II-1).

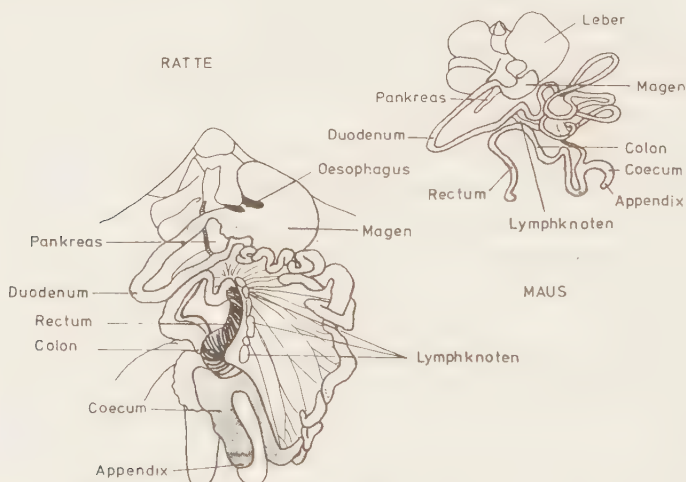


Abb.II-1 . Vergleich des Darmtraktes der Ratte mit dem der Maus.

Am Leberhilus wird nun der Ductus choledochus kanüliert. Nach Abklemmung der Mündung des Ductus choledochus in das Duodenum werden etwa 10ml KRB-Puffer bei Zimmertemperatur injiziert. Das dadurch aufgesprengte Pankreas wird anschließend herauspräpariert, Lymphknoten und Fettgewebe abpräpariert. Daraufhin wird es in Puffer suspendiert und mit einer Schere in kleinste Stücke zerteilt. Das Gewebe wird anschließend - nachdem Fettgewebe und Puffer entfernt sind - mit etwa 30 mg Collagenase, 4 ml Inkubationspuffer und 0,5 ml Trasylol

für etwa 30 Minuten im Schüttler bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wird ein Puffer zum Waschen auf 37°C erwärmt. Nach Abschluß der Inkubation wird das aufgeschlossene Pankreas für drei Minuten in einem 25ml Standzylinder, der den Waschpuffer enthält, gegeben. Anschließend wird der Waschpuffer abgossen. Das die Langerhans'schen Inseln enthaltende Sediment wird insgesamt 5 mal durch Suspension in je 25 ml Waschpuffer mit anschließender Sedimentation für ca. 3 Minuten gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wird das Sediment durch ein Plastiksieb filtriert. Das Filtrat wird in Einzelfractionen unter dem Stereomikroskop auf Inseln untersucht, die mit Hilfe einer Pasteurpipette in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden. Diese sind eisgekühlt und enthalten jeweils in 100 μl Inkubationspuffer 1 bis 5 Inseln.

Inkubation zur Bestimmung der Insulinsekretion

Je 1 Insel wird in 300 μl Inkubationspuffer 30 Minuten vorinkubiert (Vance et al., 1968). Danach wird das Inkubationsmedium durch Absaugen entfernt und die Inseln einmal mit 200 μl Puffer gewaschen. Anschließend werden die Inseln während einer oder mehrerer Perioden von jeweils 30 Minuten mit je 300 μl frischem Medium und den Zusätzen wie später angegeben inkubiert. Am Ende jeder Periode werden zwei mal 100 μl Medium entnommen und bis zur Insulinbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Inkubation zur Bestimmung der Glucoseoxidation und -aufnahme

Nach einer Vorinkubationsperiode von 30 Minuten werden 15 Inseln für 120 Minuten mit 1,0 ml KRB-Puffer (mit 0,5 g% Rinder-Albumin), $\text{U}^{14}\text{-C-Glucose}$ sowie Effektoren inkubiert. Die spezifische Aktivität der Glucose im Medium beträgt 0,3 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$. Während der Inkubation der Inselzellen werden die CO_2 -Auffanggefäße vorbereitet. Hierzu werden Polyäthylenzählgefäße (Packard) verwendet, in die ein rechteckig geschnittenes Filterpapier eingebracht wird, das mit 0,4 ml einer 25%igen Phenyläthylaminlösung in Methanol getränkt ist. Dann wird das Kunststoff-

verbindungsrohr in das Auffanggefäß eingeschoben und auf der mit einem Schnabel versehenen Seite des Verbindungsrohres 0,5 ml 8 N Schwefelsäure eingebracht. Bis zur Verwendung wird das Gefäß waagrecht gelagert aufbewahrt (Abb.II-2).

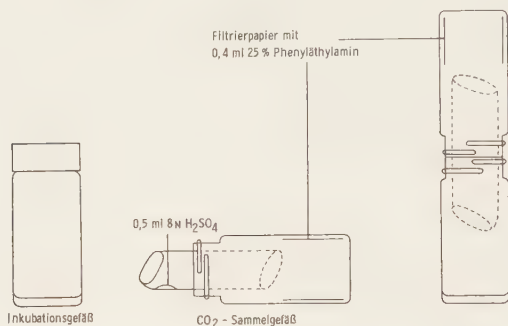


Abb.II-2 . Anordnung zum Auffangen von Kohlendioxid

Am Ende der Inkubation werden die Inkubationsgefäße in der gleichen Reihenfolge wie beim Start der Reaktion in halbmütigem Abstand geöffnet: das Kunststoffverbindungsrohr mit anhängendem Schwefelsäuretropfen wird rasch in waagerechter Stellung eingeführt und Inkubationsgefäß und CO₂-Auffanggefäß werden verbunden. Wiederfindungsversuche haben gezeigt, daß dabei praktisch kein ¹⁴CO₂ verlorengeht (Löffler, unveröffentlicht). Nach Kippen in die Senkrechte fällt der Tropfen in das Inkubationsgemisch. Die Reaktion wird gestoppt und das gelöste CO₂ ausgetrieben, das dann an das Phenyläthylamin auf dem Filtrierpapier des Auffanggefäßes gebunden wird. Nun wird eine weitere Stunde im Schüttelwasserbad inkubiert, um die CO₂-Austreibung zu vervollständigen. Nach dieser Zeit werden die Gefäße aus dem Bad genommen. Das Zählgefäß wird von seinem Verbindungsrohr befreit und nach Zusatz von 10 ml Scintillationsmischung verschlossen. Die Impulse werden in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (Tricarb, Fa.Packard) jeweils 10 Minuten gezählt. Um unspezifische Ef-

fekte auszuschließen, wird die CO_2 -Bildung entsprechender Nullwerte ohne Inseln benutzt, um die tatsächliche CO_2 -Bildung durch die Inseln zu ermitteln. Diese Impulszahl wird von allen anderen Zählraten abgezogen.

Zur Bestimmung der Größe der Glucoseaufnahme werden etwa 50 Inseln in 50 μl Inkubationsmedium für 180 Minuten inkubiert. Die Werte für die Glucoseaufnahme ergeben sich durch die Berechnung der Differenz der Glucosekonzentration im Medium vor und nach der Inkubation. Die Werte müssen noch um einen Faktor wegen der leichten Verflüchtigung des Mediums während der Inkubation korrigiert werden, was durch Parallelinkubation eines entsprechenden Leerwertes ohne Inseln erzielt wird.

Bestimmung des Insulins

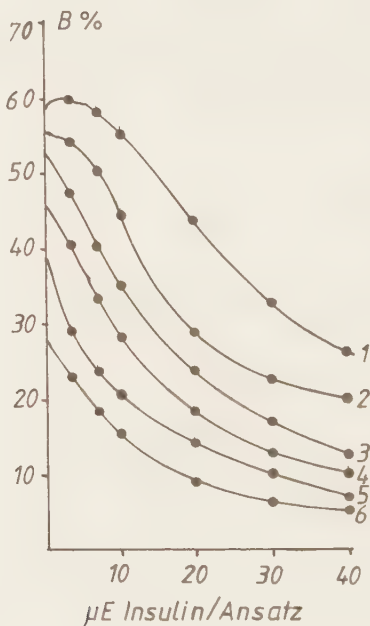
Die Insulinbestimmung erfolgt mit der radioimmunologischen Methode (**Übersicht:** Löffler u. Weiss, 1975; Böttger und Löffler, 1976). Dieser Methode liegt das Prinzip zugrunde, daß eine konstante Menge radioaktiv markierten Hormones mit variablen Mengen nicht radioaktiv markierten Hormons um die Bindung an eine limitierte Antikörpermenge konkurriert. Zum Nachweis der Menge an antikörpergebundenem markierten Hormon ist die Trennung des freien vom gebundenen Hormon notwendig. Wir verwenden dafür ein Verfahren, bei dem die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin durch Adsorption des freien Insulins an dextranbeschichtete Aktivkohle durchgeführt wird. Es handelt sich um eine Modifikation der ursprünglich von Herbert et al. (1965) sowie später von Keane et al. (1968), Poznanski (1969) und Trautschold et al. (1969) beschriebenen Methode.

Die für optimale Testbedingungen notwendige Antikörperverdünnung hängt von der Höhe des Antikörpertiters, aber auch von der spezifischen Aktivität und der Konzentration des Radioinsulins ab und muß daher in einem Vorversuch für jede Radioinsulincharge neu ermittelt werden. Die Antikörperkonzentration sollte so gewählt werden, daß bei einer Konzentra-

tion von 3 bis 5 μE Radioinsulin/Ansatz etwa $50 \pm 10\%$ des zugesetzten Radioinsulins gebunden und durch Zugabe von 10 μE Standardinsulin eine größtmögliche Abnahme der Bindung des markierten Insulins erreicht wird. Abb.II-3 zeigt ein Beispiel der prozentualen Änderungen der Bindung des Radioinsulins an den Antikörper mit und ohne Zusatz von Standardinsulin in Abhängigkeit von der Antikörperverdünnung.

Abb.II-3 . Änderung der prozentualen Bindung von Radioinsulin in Abhängigkeit von der Antikörperverdünnung.

1 = 1:7500; 2 = 1:10000;
3 = 1:12 500; 4 = 1:15000;
5 = 1:20 000; 6 = 1:25000.



Bei der Handhabung insulinhaltiger Proben, wie sie bei der Untersuchung der Insulinsekretion aus Inselzellen anfallen, ist zu beachten, daß Insulin von der Wandung der Glas- bzw. Kunststoffgefäße adsorbiert werden kann. Diese Adsorption, die beträchtliche Ausmaße annehmen kann, wird durch Zusatz von Albumin verhindert. Im allgemeinen ist hierfür eine Albuminkonzentration von 0,5 bis 1 % ausreichend.

Zur Ermittlung der Standard Eichkurve werden aus Albuminpuffer, Standard- und Radioinsulin sowie Antikörper in der im Vorversuch ermittelten optimalen Verdünnung bestehende Ansätze mehrfach pipettiert. Abb.II-4 zeigt eine derart ermittelte Eichkurve.

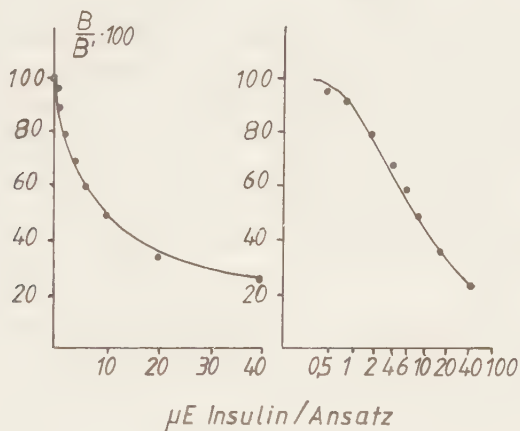


Abb.II-4 . Eichkurve für Insulin in linearer und logarithmischer Auftragung. B: Radioinsulin gebunden in Anwesenheit der jeweiligen Mengen an Standardinsulin. B': Radioinsulin gebunden in der Probe ohne Zusatz von Standardinsulin.

Zur Bestimmung des Insulingehaltes in den Inkubationsgemischen wird 0,1 ml der zu bestimmenden Probe mit 0,2 ml Albuminpuffer, 0,1 ml Antikörperlösung sowie 0,1 ml Radioinsulin versetzt (Dreifachproben), eine Minute gemischt und für 120 Minuten bei 37° C inkubiert. Zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin wird das Gemisch anschließend mit 0,5 ml Kohle-Dextran-Gemisch versetzt, wieder eine Minute gemischt und dann 4 Minuten bei 12 000x g zentrifugiert. Zur Messung der Radioaktivität wird je 0,5 ml des Überstandes eingesetzt. Während der Inkubation der Proben mit Antikörper und Radioinsulin werden die wahrscheinlich durch Radiolyse entstandenen Spaltprodukte des Radioinsulins an Albumin gebunden. Bei der Trennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin werden sie deshalb nicht an die dextranbeschichtete Aktivkohle adsorbiert, sondern bleiben im Überstand und täuschen antikörpergebundenes Insulin vor. Bei der Berechnung der prozentualen Bindung muß ihr Anteil an der Gesamtmenge des Radioinsulins berücksichtigt werden.

Die prozentuale unspezifische Aktivität errechnet sich aus der Radioaktivität im Überstand bei Inkubation ohne Antikörper nach folgender Formel:

$$\text{unspezifische Aktivität} = \frac{(K - NE) \cdot 2 \cdot 100}{St - NE}$$

Dabei ist K der Kontrollwert, d.h. die Radioaktivität in 0,5 ml Überstand bei Inkubation von Radioinsulin ohne Antikörper, NE der Nulleffekt und St der Tracerstandard, d.h. die Gesamtmenge der im Ansatz vorhandenen Radioaktivität.

Die prozentuale Bindung des Radioinsulins an den Antikörper wird nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Bindung (\%)} = \frac{((M - NE) - (K - NE)) \cdot 2 \cdot 100}{St - NE}$$

Dabei ist M = Meßwert, NE = Nulleffekt, St = Tracerstandard und K = Kontrollwert, d.h. die Radioaktivität im Überstand bei Inkubation ohne Antikörper.

Wie bei dem in Abb.II-4 gezeigten Beispiel wird bei der graphischen Darstellung der Eichkurve der Abfall der prozentualen Bindung des Radioinsulins gegen die Menge an zugesetztem Standardinsulin aufgetragen. Anhand dieser Eichkurve, die nur über kurze Strecken annähernd linear ist, wird die Insulinkonzentration unbekannter Proben ermittelt. Da dieses Verfahren sehr zeitraubend ist, sind viele Versuche unternommen worden, die Eichkurve mathematisch so zu bearbeiten, daß sie sich in einer linearen Form darstellen läßt, die die rechnerische Ermittlung der Insulinkonzentration von Proben mit unbekanntem Gehalt ermöglicht.

Als geeignet haben sich dabei mathematische Linearisierungen der hyperbolischen Abhängigkeit des Quotienten B/F von der Hormonkonzentration erwiesen.

Die zugrundeliegenden Regressionsgeraden sind:

$$B^X/B^{X'} = 1 + b \cdot x \quad \text{oder} \quad \text{logit}((B^X/B^{X'}) \cdot 100) = a + b \cdot \log x$$

Dabei ist $B^{X'}$ Radioinsulin, das antikörpergebunden ist bei einer Standardkonzentration von 0 $\mu\text{E/ml}$, B^X das Radioinsulin, das bei der dem jeweiligen Eichpunkt entsprechenden Konzen-

tration an Standardinsulin antikörpergebunden ist, X das Standardinsulin, a der Schnittpunkt auf der y-Achse und b der Regressionskoeffizient.

Die Koeffizienten a und b können mit Hilfe der heute üblichen programmierbaren elektronischen Taschenrechner ermittelt und mit ihnen dann der Insulingehalt der Inkubationsgemische errechnet werden.

Bestimmung des Protein- und Nucleinsäuregehaltes von Inseln

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Inseln setzen wir die photometrische Methode nach Lowry et al. (1951) ein. Diese Methode zur Bestimmung kleiner Proteinkonzentrationen beruht auf einer Kombination der Biuretreaktion mit Folin-Phenol-Reagens. Diese Kombination ist etwa 100mal empfindlicher als die Biuretreaktion allein. Zur Ermittlung des Proteingehaltes werden die Inseln homogenisiert, das Protein mit Trichloressigsäure gefällt, anschließend der Niederschlag wieder in Lauge gelöst und der Bestimmung zugeführt.

Die DNA-Bestimmung erfolgt nach der Methode von Kissane und Robins (1958). Bei der fluorimetrischen Bestimmung dient Kalbs-Thymus-DNA als Standard.

Das Trockengewicht von Inseln wird nach Erhitzen von jeweils 10 Inseln für 20 Stunden auf 110°C mit Hilfe einer Mikrowaage bestimmt.

III. E r g e b n i s s e

Inselpräparation

Da von Collagenase, einem aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnenen Collagen abbauenden Enzym oder auch Enzymgemisch Chargen verschiedener Firmen verwendet wurden und sich diese Chargen im allgemeinen in ihrer Verwendbarkeit stark unterscheiden, müssen in Vorversuchen für jede Charge die optimale Collagenasekonzentration für die Inkubation und die Inkubationsdauer ermittelt werden.

Abb.III-1 zeigt eine Dunkelfeldaufnahme von durch Collagenasepräparation gewonnenen Inseln. Diese Inseln sind weitgehend frei von acinärem Gewebe.

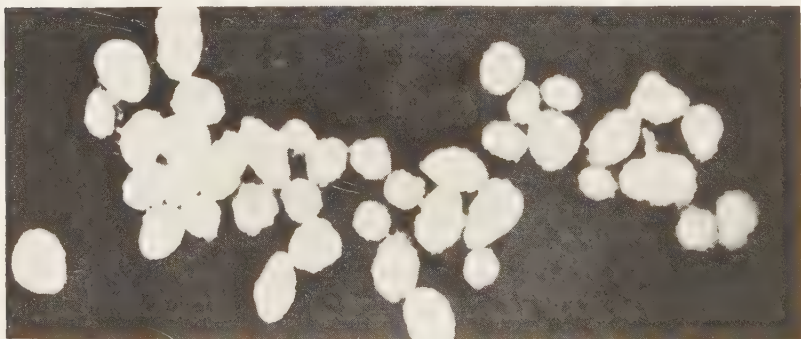


Abb.III-1 . Isolierte Langerhans'sche Inseln aus dem Pankreas der Ratte (30fache Vergrößerung)

Der Durchmesser der Ratteninsel liegt zwischen 50 und 200 μ , ihr Feuchtgewicht bei 10 bis 50 μ g, wovon das Trockengewicht etwa 25% beträgt. Mäuseinseln weisen eine ähnliche Größe auf. Eine Insel enthält im Mittel etwa 4,16 μ g Protein und im Mittel etwa 103 ng DNA. Normale Inseln enthalten etwa 70 bis 85% β -Zellen.

Insulinsekretion in Abhängigkeit vom Glucoseangebot im Inkubationsmedium

Bei der Untersuchung der quantitativen Beziehung zwischen Insulinsekretion und Glucoseangebot findet sich eine strenge Abhängigkeit der Insulinfreisetzung von der Glucosekonzentration im Medium. Auffallend ist dabei der sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve, wobei das System in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 10 mM (90 und 180 mg/100ml) besonders empfindlich reagiert (Abb.III-2).

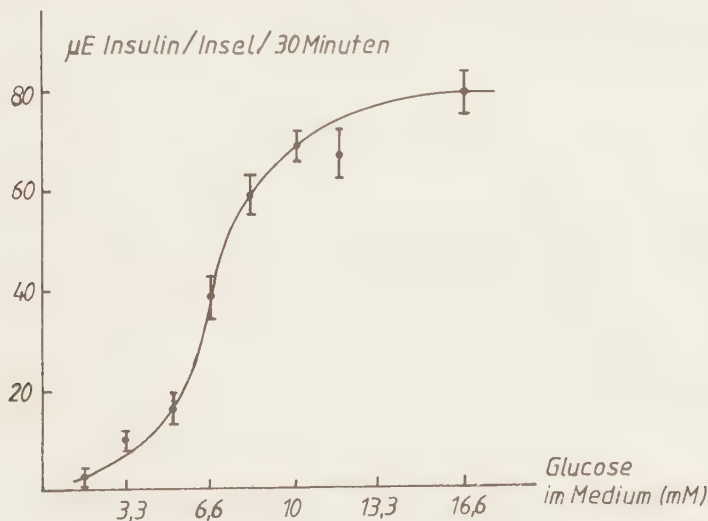


Abb.III-2 . Abhängigkeit der Insulinsekretion von der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium (senkrechte Linien = SEM ; n = 10).

Dieser Bereich entspricht der physiologischen Schwankung der Blutzuckerkonzentration. Die Schwellenkonzentration liegt bei 5 mMol/Liter (90 mg/100ml), die halbmaximale Stimulierung erfolgt bei etwa 7 mMol/Liter (126 mg/100ml). Die halbmaximale Stimulierung entspricht 1,5 bis 2,0 µE Insulin pro Insel und Minute. Die maximale Antwort erfolgt bei 17 mMol/Liter (306mg/100ml).

Glucoseoxidation und -aufnahme in Abhängigkeit vom Glucoseangebot im Inkubationsmedium

Als Meßgröße für den Glucoseumsatz der Langerhans'schen Inseln dient die CO_2 -Bildung aus uniform markierter Glucose. Es ergibt sich - wie Abb.III-3 zeigt - eine Abhängigkeit der CO_2 -Bildung aus Glucose vom Glucoseangebot.

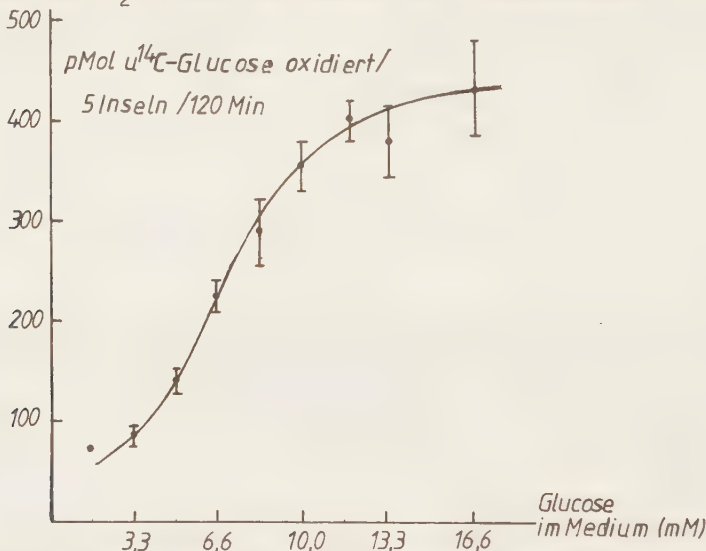


Abb.III-3 . Abhängigkeit der CO_2 -Produktion vom Glucoseangebot (senkrechte Linien $\equiv$ SEM, $n = 10$)

Trägt man die Geschwindigkeit der Glucoseoxidation gegen die Konzentration im Medium auf, so zeigt sich ebenfalls eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve, deren steilster Verlauf wieder zwischen 5 und 10 mM (90 und 180 mg/100ml) liegt. Die maximale Stimulierung wird mit 50 pMol pro Insel und Stunde erreicht. Dieselbe Antwort der CO_2 -Bildung auf die Glucosekonzentration im Medium läßt sich mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter und $6\text{-}^{14}\text{C}$ -markierter Glucose nachweisen. Zusätzlich findet mit dem Anstieg der extracellulären Glucosekonzentration eine vermehrte Aufnahme in die Zellen statt.

Das Verhältnis der CO_2 -Bildung aus in C_1 markierter Glucose

zur CO_2 -Produktion aus in C_6 markierter Glucose sinkt von 6 bei einer Glucosekonzentration von 3,3 mM (59,4 mg/100ml) auf 1 bei einer Glucosekonzentration von 13,3 mM (239,4 mg/100ml) (Abb.III-4).

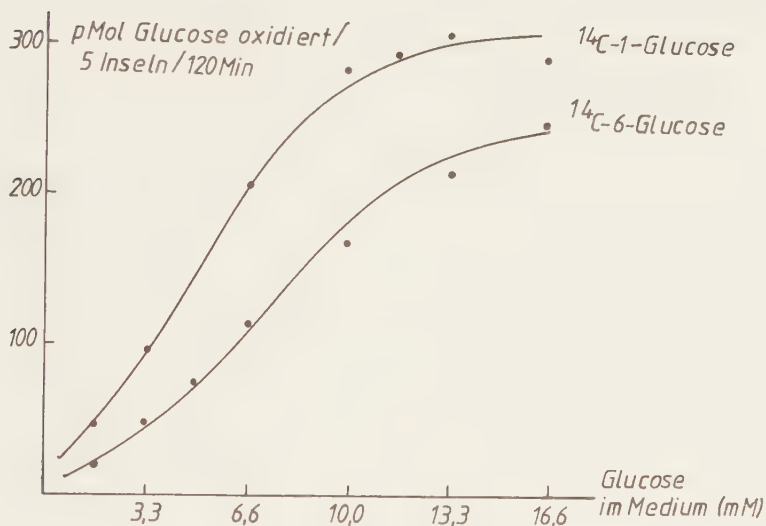


Abb.III-4 . CO_2 -Produktion aus 1- ^{14}C markierter und 6- ^{14}C markierter Glucose in Abhängigkeit vom Glucoseangebot (n = 6).

Die Bestimmung der Glucoseaufnahme ist bei Inkubation Langerhans'scher Inseln nur unter großen Schwierigkeiten zu erreichen. Es werden dabei jeweils 40 bis 70 Inseln in nur 50 μl Medium für 3 Stunden inkubiert und der Glucosegehalt am Beginn und Ende der Inkubationszeit bestimmt. Dabei ergab sich eine Glucoseaufnahme von 0,96 bzw. 1,8 bis 2,4 nMol Glucose/ 5 Inseln/180 Minuten bei Konzentrationen von 6,6 bzw. 13,3 mMol Glucose im Inkubationsmedium.

Einfluß von Theophyllin und Dibutyryl-Cyclo-AMP auf die Insulinsekretion

Abb.III-5 zeigt den Einfluß von Theophyllin in einer Konzentration von $10^{-3}M$ auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion. Eine deutliche Steigerung findet sich nur in Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen, d.h. zwischen 7 und 16,6 mMol/Liter (126 und 298,8 mg/100ml) Glucose. Bei niedrigeren Glucose-

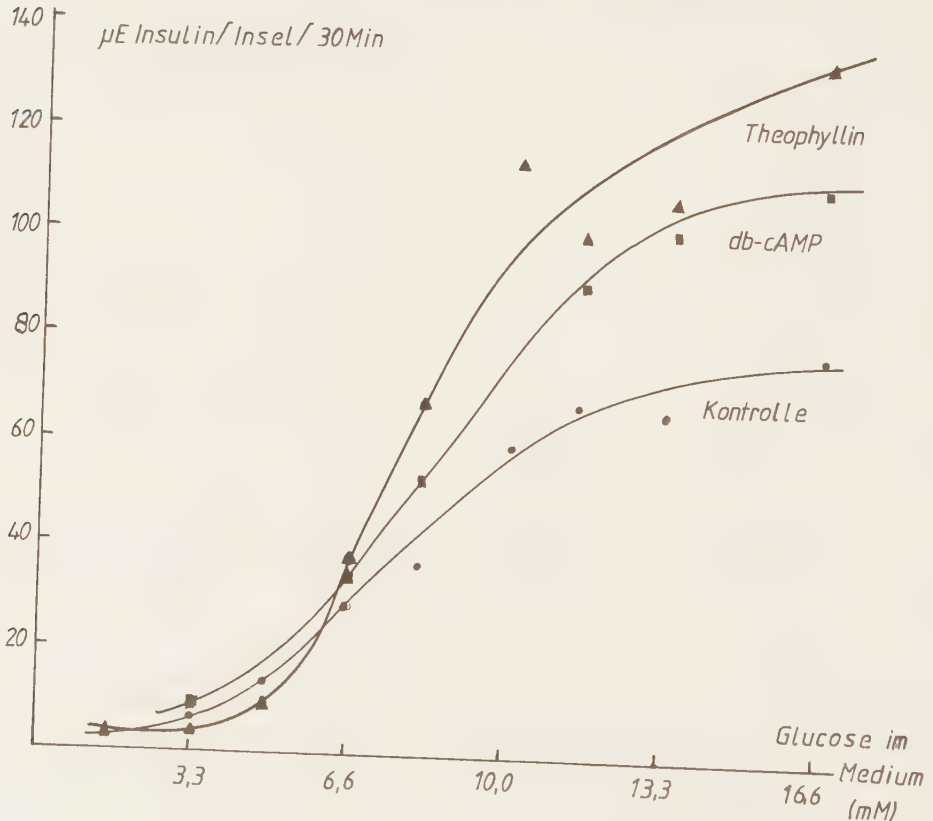


Abb.III-5 . Einfluß von Theophyllin bzw. db-CAMP (jeweils in einer Konzentration von 1 mM) auf die Insulinsekretion in Abhängigkeit vom Glucoseangebot (n = 6)

Konzentrationen oder in Abwesenheit von Glucose ist eine Wirkung des Nucleotides nicht nachweisbar. Ebenso wirkt Dibutyryl-Cyclo-AMP, das acylsubstituierte Derivat, in einer Konzentration von ebenfalls 1 mM (Abb.III-5).

Einfluß von Theophyllin und Dibutyryl-Cyclo-AMP auf die Glucoseoxidation

Abb.III-6 zeigt die Abhängigkeit der Glucoseoxidation von der Glucosekonzentration im Medium in Gegenwart von $10^{-3}M$ Theophyllin bzw. Dibutyryl-Cyclo-AMP: beide Effektoren der Insulinsekretion besitzen keinen Einfluß auf die Glucoseoxidation.

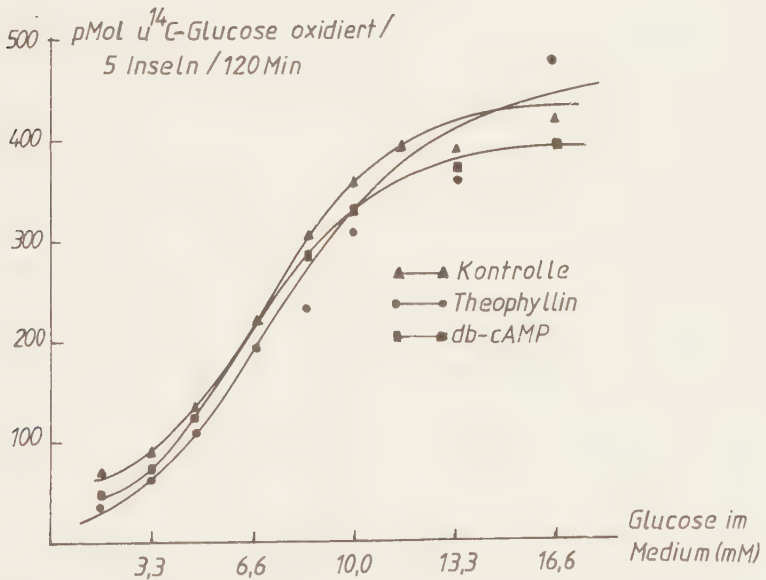


Abb.III-6 . Einfluß von Theophyllin bzw. Dibutyryl-Cyclo-AMP auf die Glucoseoxidation in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium (n = 6)

Einfluß von Glibenclamid und Diazoxid auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation

Tabelle III-1 zeigt einen Vergleich der Wirkung von Glibenclamid, einem Sulphonylharnstoff (Konzentration 0,6 µg/ml) und Diazoxid (Konzentration 30 µg/ml) sowie von Kombinationen dieser Stoffe auf die Insulinsekretion und Glucoseoxidation isolierter Inseln. Während diese Effektoren die Insulinsekretion unterschiedlich beeinflussen, bleibt die Glucoseoxidationsrate weitgehend unverändert.

Tabelle III-1 . Insulinsekretion und Glucoseoxidation isolierter Langerhans'scher Inseln

	Insulinsekretion µE/Insel · 30Min.		Glucoseoxidation pMol/Insel · 30Min.
Kontrolle (5 mM Glucose)	24,1 ±	2,8 (49)	6,5 ± 0,9 (5)
Kontrolle (13,3 mM Glucose)	78,9 ±	10,1 (49)	23,5 ± 2,6 (5)
Theophyllin (10^{-3} M)	112,5 ±	22,4 (18)	26,5 ± 1,3 (4)
db-cAMP (10^{-3})	102,7 ±	12,3 (12)	24,3 ± 2,4 (4)
Glibenclamid (0,6 µg/ml)	98,4 ±	15,2 (6)	23,9 ± 1,9 (4)
Diazoxid (30 µg/ml)	34,3 ±	7,5 (6)	25,2 ± 2,2 (4)
Diazoxid + Theophyllin	35,9 ±	5,2 (6)	22,2 ± 1,6 (4)
Diazoxid + Glibenclamid	100,4 ±	14,8 (5)	21,4 ± 2,4 (4)

Einfluß von Hemmstoffen der Glykolyse und der mitochondrialen Oxidation auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation

Abb.III-7 zeigt den Einfluß steigender Konzentrationen von Natriumfluorid, einem Hemmstoff der Enolasereaktion der Glykolyse, auf die Insulinsekretion und Glucoseoxidation. Während Fluorid die Glucoseoxidation in Konzentrationen zwischen 0,1 und

1,0 mM sehr wirkungsvoll hemmt, wird die Insulinsekretion nur mäßig beeinflusst.

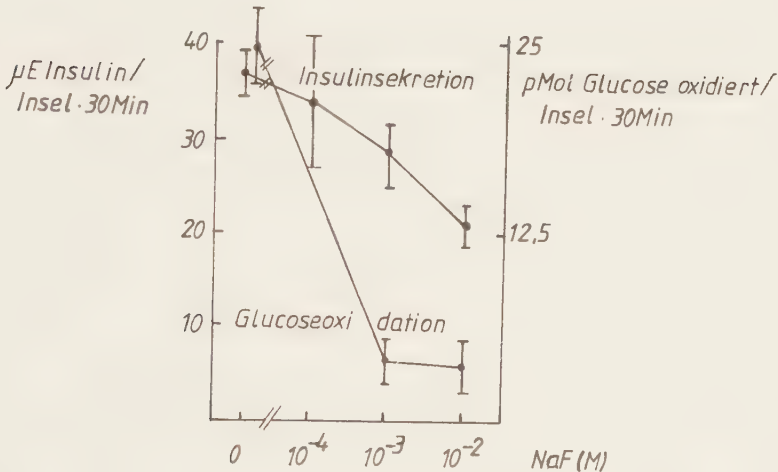


Abb. III-7 . Beeinflussung der glucoseinduzierten Insulinsekretion und Glucoseoxidation durch steigende Konzentrationen von Natriumfluorid (n = 6)

Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei der Anwendung von Jodacetat, einem Hemmstoff der Glycerinaldehyddehydrogenase-Reaktion der Glykolyse. Kaliumcyanid, ein Inhibitor der mitochondrialen Atmung, hemmt sowohl die Insulinsekretion als auch die Glucoseoxidation (Tabelle III-2).

Tabelle III-2 . Einfluß von Jodacetat und Kaliumcyanid auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation isolierter Langerhans'scher Inseln

	Insulinsekretion μE/Insel · 30Min.	Glucoseoxidation pMol/Insel · 30Min.
Kontrolle (13,3 mM Glucose)	78,9 ± 10,1 (49)	23,5 ± 2,6 (5)
Jodacetat (5 · 10 ⁻⁴ M)	49,8 ± 4,7 (4)	3,1 ± 0,8 (4)
Kaliumcyanid (10 ⁻³ M)	10,4 ± 4,3 (4)	<2,0 (4)

IV. Diskussion

Probleme bei der Inselpräparation

Für die Diskussion unserer Versuchsergebnisse ist die Kenntnis einiger anatomischer Besonderheiten des Pankreas unerläßlich. Die Langerhans'schen Inseln liegen wahllos zwischen acinärem, exokrinen Gewebe über das Pankreas verstreut und machen nicht mehr als 1% der Gesamtmasse dieses Organs aus (Hellman und Hellerström, 1969).

Sie sind deshalb nur unter großen Schwierigkeiten zu präparieren. Da die Inselzahl vom Entwicklungsalter, von der Nahrung, vom Menstruationscyclus und individuellen Faktoren der Versuchstiere abhängt, ist es schwierig, genauere Angaben über die Zahl und Größe der Inseln bei den einzelnen Species zu machen (Findlay und Ashcroft, 1975); beim Menschen enthält das Pankreas nach groben Schätzungen etwa 200 000 Inseln. In jeder Insel von etwa 0,2 mm Durchmesser (vgl.S.22) finden sich etwa 3000 β -Zellen, was eine β -Zellzahl von etwa 600 Millionen pro Pankreas bedeutet.

Im allgemeinen nimmt die Präparation von Inseln, d.h. die Zubereitung der Pufferlösungen, die Gewinnung der Pankreata von 4 bis 5 Versuchstieren und vor allem das Sammeln der Inseln unter dem Stereomikroskop mindestens 3 Stunden in Anspruch. Nach unserer Erfahrung sind Inselpräparationen von gleichbleibend guter Qualität nicht leicht zu erzielen, da eine neue Lieferung von Versuchstieren, die Verwendung einer neuen Collagenasecharge (vgl.S.22) und möglicherweise auch klimatische Veränderungen zur Folge haben können, daß eine bewährte Präparationsanordnung plötzlich keine Inseln mehr liefert.

Hinzu kommen noch weitere Schwierigkeiten: geht man von einem mittleren Frischgewicht von 30 μ g (Größenordnung der Ratteninseln nach unseren Untersuchungen 10 bis 50 μ g, vgl. S.22) aus, so stehen bei einem Experiment, bei dem durch Collagenasepräparation etwa 200 bis 300 Inseln gewonnen werden können, etwa 6 bis 9 mg Gewebe zur Verfügung.

Verglichen mit der in Untersuchungen z.B. des Fett- oder Leberstoffwechsels zur Verfügung stehenden Menge biologischen Materials ist diese Gewebsmenge sehr gering; dies besitzt insofern Bedeutung, als bei den meisten Untersuchungen des Zellstoffwechsels die untersuchten Parameter quantitativ auf die Gewebsmasse bezogen werden. Da im Inkubationsexperiment oft nur wenige Inseln von einem Feuchtgewicht im Mikrogrammbereich eingesetzt werden, mußten für diesen Bereich Mikromethoden von hoher Genauigkeit erarbeitet werden. Aus diesen Gründen konnten Zeitabhängigkeiten bisher nur schlecht untersucht und nur wenige Stoffwechselparameter gleichzeitig einer Messung zugänglich gemacht werden.

Methoden zum Studium Langerhans'scher Inseln

Diese Besonderheiten des Inselsystems liefern die Erklärung dafür, warum es so lange gedauert hat, bis sich die experimentelle Forschung der Untersuchung von Säugetierinseln zugewendet hat.

Heute existieren zur Untersuchung des Inselsystems folgende *in vitro* Methoden: die Technik des isoliert perfundierten Pankreas, die Methode der perfundierten Insel und die Untersuchung der isoliert inkubierten Insel, eine statische Methode, bei der das Medium während der Inkubation unverändert bleibt. Claes Hellerström (Uppsala) isolierte erstmalig Anfangs der Sechziger Jahre Langerhans'sche Inseln von normalen und ob/ob-Mäusen, von Ratten und Meerschweinchen durch sog. Mikrodissektion (Hellerström, 1964). Bei dieser Methode werden die Inseln nicht - wie bei anderen Verfahren - durch proteolytische Enzyme beeinflusst. Derart gewonnene Inseln können bei 8°C mehrere Wochen aufbewahrt werden. Diese Technik bleibt jedoch vorwiegend auf die Inseln von ob/ob-Mäusen beschränkt, da das Pankreasgewebe dieser fettsüchtig-hyperglykämischen Mäusemutante aus relativ größeren Inseln besteht. Diese Inseln sollen funktionell keinen Unterschied zu denen normaler Mäuse aufweisen (Lernmark, 1971).

Der Vorteil der für unsere Untersuchungen gewählten Technik der isoliert inkubierten Insel liegt darin, daß durch die enzymatische Entfernung des acinären, exokrinen Anteils die Insel als solche untersucht werden kann. Damit können Effektoren des Inselstoffwechsels direkt an die Insel gebracht werden. Mit diesem Vorteil sind jedoch auch verschiedene Nachteile verbunden: etwaige Wechselwirkungen mit dem exokrinen Anteil können nicht mehr erkannt werden, durch die Devaskularisierung und Denervierung kann die Bedeutung des Gefäß- und Nervensystems nicht mehr in die Interpretation von Befunden einbezogen werden. Weiterhin ist es schwierig zu beurteilen, inwieweit durch die Collagenaseeinwirkung auch interstitielles Collagen zwischen α - und β -Zellen abgebaut und ob auch die Oberfläche der β -Zellen durch die proteolytische Wirkung dieses (relativ unreinen) Enzymes beschädigt wird. Sicher ist außerdem nicht, ob das Enzym vollständig bei der Waschprozedur (vgl. S. 15) ausgewaschen wird. So hat auch in jüngster Zeit die Arbeitsgruppe von Franz Matschinsky in St. Louis Bedenken gegen die Intaktheit collagenasebehandelter Inseln erhoben (Norfleet et al., 1975).

Zudem müssen wir mit Nachdruck darauf hinweisen, daß auch isolierte Langerhans'sche Inseln keine reine β -Zellpopulation darstellen, sondern noch bis zu 30% andere Zellen enthalten (D-Zellen, α_1 - und α_2 -Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Nervenzellen).

Die sinnvollste, wenn auch experimentell noch aufwendigere Anordnung stellt somit die isolierte β -Zelle dar: so gibt es bisher Organkulturen von fetalem Pankreas, die zu über 90% aus betaähnlichen Zellen bestehen. Monolayer, d.h. aus einer Zellschicht bestehende Kulturen, die aus dem Pankreas neugeborener Ratten durch Collagenase- und Trypsinbehandlung gewonnen werden, eignen sich ebenfalls zum Studium der Funktion der β -Zellen. Die Zellen dieser Kulturen sind vorwiegend β -Zellen (Hilwig et al., 1968; Hilwig und Schuster, 1970).

Intaktheit unserer Inselpräparation

Daß sich Inseln unter in vitro Bedingungen wie in vivo verhalten, kann wie schon angedeutet zwar nie mit absoluter Sicherheit angenommen werden, es sprechen nach unserer Auffassung aber einige Gründe für eine derartige Annahme. Als wesentliche Kriterien für die Intaktheit unserer Präparationen nehmen wir die Erhöhung der Insulinsekretionsrate nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium, die charakteristische Kinetik dieses Vorganges, die maximale Insulinfreisetzung sowie die Reproduzierbarkeit dieser Daten mit geringen Standardabweichungen bei über 100 Experimenten.

Die Inkubationsexperimente führten wir mit einem Puffer durch, der Pyruvat (normale Plasmakonzentration 0,1 mM) und Glutamat (normale Plasmakonzentration 30 - 70 μ M) in Konzentrationen von jeweils 10 mM als Energie- bzw. Aminogruppendonatoren enthält. Nach den Untersuchungen von Gerold Grodsky in San Francisco (1963) und Willy Malaisse in Brüssel (1969) besitzt Pyruvat keine Wirkung auf die Insulinfreisetzung am isoliert perfundierten Pankreas bzw. an inkubierten Pankreasstücken. Auch wir fanden keine Stimulierung der Insulinsekretion an isoliert inkubierten Inseln. Da die Aktivität von Gluconeogeneseenzymen in Inseln gering ist (Trautschold et al., 1968), ist die Wahrscheinlichkeit auch gering, daß intracellulär aus Pyruvat Glucose entsteht.

Durchschnittlich findet sich in der Literatur (Tab.IV-1) eine 10 bis 40fache Steigerung der basalen Insulinausschüttung in Abhängigkeit vom verwendeten experimentellen Modell. Allen Befunden gemeinsam ist der sigmoidale Bezug zwischen Glucosekonzentration und Insulinsekretion. Eine weitgehende Übereinstimmung zeigen auch die maximalen Insulinsekretionsraten isoliert inkubierter Systeme, die zwischen 240 und 334 μ E Insulin/Insel/90 Minuten liegen. Von diesen Werten weichen nur die Befunde von Ashcroft et al.(1972b) mit 470 μ E Insulin/Insel/90 Minuten ab, die allerdings in Gegenwart von 5 mM Coffein, einem Potentiator der glucoseinduzierten Insulinsekretion, erzielt wurden. Nach diesen Autoren liegt die Schwellenglucosekonzentration an Mäuseinseln bei etwa 4 mM, die halbmaximale Stimulierung (was der K_M entspricht)

Tabelle IV-1 . Glucoseinduzierte Insulinsekretion

Species/Anordnung/ Autor	Kinetik/maximale Sekretionsstimulierung x fach bei y mM Glucose/ Insulinmenge
Rattenpankreasstücke (Malaisse et al., 1967)	sigmoidal/ etwa auf das 10fache bei 42mM/ 130 μ E/mg Gewebe/90 Min.
Isolierte Ratteninsel (Löffler et al., 1972)	sigmoidal/ etwa auf das 20fache bei 16,6mM/ 240 μ E/Insel/90 Min.
Isolierte Mäuseinsel (Ashcroft et al., 1972b)	sigmoidal/ etwa auf das 30-40 fache bei 18-20 mM/ 470 μ E/Insel/90 Min.
Isolierte Ratteninsel (Malaisse et al., 1972)	sigmoidal/ etwa auf das 10fache bei 16,6mM/ 334 μ E/Insel/90 Min.
Isolierte Ratteninsel (Lambert, 1975)	sigmoidal/ etwa auf das 20fache bei 22mM/ 293 μ E/Insel/90 Min.

bei 8 mM (bei Ratteninseln bei 6mM), die maximale bei 18-20 mM Glucose (was der $v_{\max}$ entspricht). Diese Befunde stimmen weitgehend mit den unserigen (5mM, 7mM, 17mM), die 1972 publiziert wurden (Löffler et al., 1972) und den Angaben von Gerich et al. (1976) mit 4,5 mM bzw. 8mM und 25mM überein.

Während sich das Sekretionsverhalten unserer Inselpräparationen weitgehend mit dem anderer Autoren deckt, divergieren die Angaben über Feucht- bzw. Trockengewicht, Protein- und DNA-Gehalt von Inseln in der Literatur nicht unerheblich (Tab.IV-2). Die Ursache dieser Divergenzen ist nicht klar; sie könnte durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung des Trockengewichtes bedingt sein, aber auch auf unterschiedliches Alter oder Ernährung sowie Speciesunterschiede der Versuchstiere zurückgeführt werden.

Es wäre wichtig, den Protein- bzw. DNA-Gehalt von Inseln einer intensiveren Studie zu unterziehen, da es aufgrund der unterschiedlichen Größe der Inseln genauer ist, Parameter auf diese Größen (Protein- oder DNA-Gehalt) als auf die Inselzahl zu beziehen. So secernieren z.B. größere Inseln bezogen auf ihr Trockengewicht weniger Insulin als kleinere Inseln.

Tabelle IV-2 . Trockengewicht, Wasser-, DNA- und Proteingehalt sowie Volumen isolierter Inseln

Untersuchte Größe	Menge	Species	Autoren
Trockengewicht	0,2 - 4 µg/Insel	Maus	Hellerström (1964)
Trockengewicht	3 -80 µg/Insel	ob/obMaus	Hellerström (1964)
Trockengewicht	0,5µg/Insel	Maus	Ashcroft et al.(1970)
Trockengewicht	0,67±0,02µg/Insel	Maus	Hedekov et al.(1972)
Trockengewicht	1,14µg/Insel	Ratte	Green & Taylor (1972)
Trockengewicht	2,5 -12,5µg/Insel	Ratte	diese Arbeit
Wassergehalt	75%	ob/obMaus	Matschinsky & Ellerman (1968)
DNA-Gehalt	16,4±1,7ng/Insel	Maus	Hedekov et al.(1972)
DNA-Gehalt	50± 0,05 ng/Insel	Ratte	Green & Taylor (1972)
DNA-Gehalt	103 ng/Insel	Ratte	diese Arbeit
DNA-Gehalt	43,6 ng/Insel	Ratte	Agren et al.(1976)
Proteingehalt	540± 50 ng/Insel	Mensch	Ashcroft et al.(1971)
Proteingehalt	780± 70 ng/Insel	Ratte	Green & Taylor (1972)
Proteingehalt	4160 ng/Insel	Ratte	diese Arbeit
Volumen	2nl/Insel	Maus	Ashcroft et al.(1970)

Bedeutung der Glucoseoxidation für die glucoseinduzierte Insulinsekretion

Unter den vielen bekannten Stimulatoren und Inhibitoren der Insulinsekretion gilt D-Glucose als der wesentliche physiologische Stimulus für die Insulinfreisetzung (Anderson und Long, 1947; Grodsky, 1963). Obwohl auch andere Stoffe wie z.B. Aminosäuren, Fettsäuren und verschiedene Hormone die Insulinsekretion stimulieren, benötigen sie fast alle die Gegenwart einer Mindestglucosekonzentration zur Entfaltung ihrer stimulierenden Wirkung, weshalb man von dem permissiven Effekt der D-Glucose spricht.

Die Vorstellung, daß die Verstoffwechselung von D-Glucose für die Wirkung dieser Hexose auf die Insulinsekretion von Bedeutung ist, leitet sich aus Untersuchungen der Wirkungen verschiedener Zucker auf die Insulinfreisetzung ab.

So rufen metabolisierbare Zucker i.a. eine Insulinsekretion hervor; dies trifft für D-Glucose und D-Mannose sowie - zumindest bei einigen Species - für D-Fructose zu.

Dagegen bewirken Zucker, die nicht phosphoryliert oder nach Phosphorylierung nicht weiter abgebaut werden, keine Insulinfreisetzung (Grodsky et al., 1963; Coore und Randle, 1964). Zu diesen Substanzen zählt neben der nicht metabolisierbaren 3-O-Methylglucose auch das Glucosederivat 2-Desoxyglucose, das zwar phosphoryliert, dann aber nicht weiter im Stoffwechsel umgesetzt wird. Ebenso stimuliert D-Galaktose, die von der Insel nicht verstoffwechselt werden kann, die Insulinsekretion nicht (Jarrett und Keen, 1968). Hemmstoffe der Hexokinase wie Mannoheptulose und D-Glucosamin stellen spezifische Hemmstoffe der Insulinfreisetzung dar (Coore und Randle, 1963, 1964).

In die Inseln gelangt D-Glucose über ein stereospezifisches Transportsystem, das mit einer Maximalgeschwindigkeit von etwa $400 \mu\text{Mol/Stunde/g}$ Trockengewicht und einer K_M von etwa 50 mM nicht geschwindigkeitslimitierend für den Glucosestoffwechsel von Inseln sein soll (Hellerström, 1975).

Diese Untersuchungen legten die Annahme nahe, daß die Phosphorylierung von D-Glucose bzw. D-Mannose und ihr weiterer Stoffwechsel mit der Wirkung dieser beiden Zucker auf die Insulinsekretion im Zusammenhang steht. Wir bestimmten deshalb die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus uniform markierter Glucose, die ein Maß für den Abbau dieser Hexose über den Pentosephosphatweg, die aerobe Glykolyse und den Citratcyclus darstellt. Die Geschwindigkeit der CO_2 -Bildung aus Glucose zeigt dabei große formale Ähnlichkeit mit der Geschwindigkeit der Insulinfreisetzung aus Inseln: in beiden Fällen (Abb.III-2, S.23 und Abb.III-3, S.24) liegt eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve mit dem steilsten Anstieg zwischen 5 und 10 mM Glucose im Medium vor, d.h. in dem Bereich, in dem in vivo der Blutzucker reguliert wird.

Trägt man Insulinsekretion und Glucoseoxidation bei steigender Glucosekonzentration gegeneinander auf, so ergibt sich erwartungsgemäß eine lineare Beziehung (Abb.IV-1, S.37). Eine ähnliche Beziehung haben Ashcroft et al. (1972b) auch für den Zusammenhang zwischen Insulinsekretion und der Glucoseutilisation, d.h. dem Gesamtglucoseumsatz der Inseln, beschrieben (siehe später).

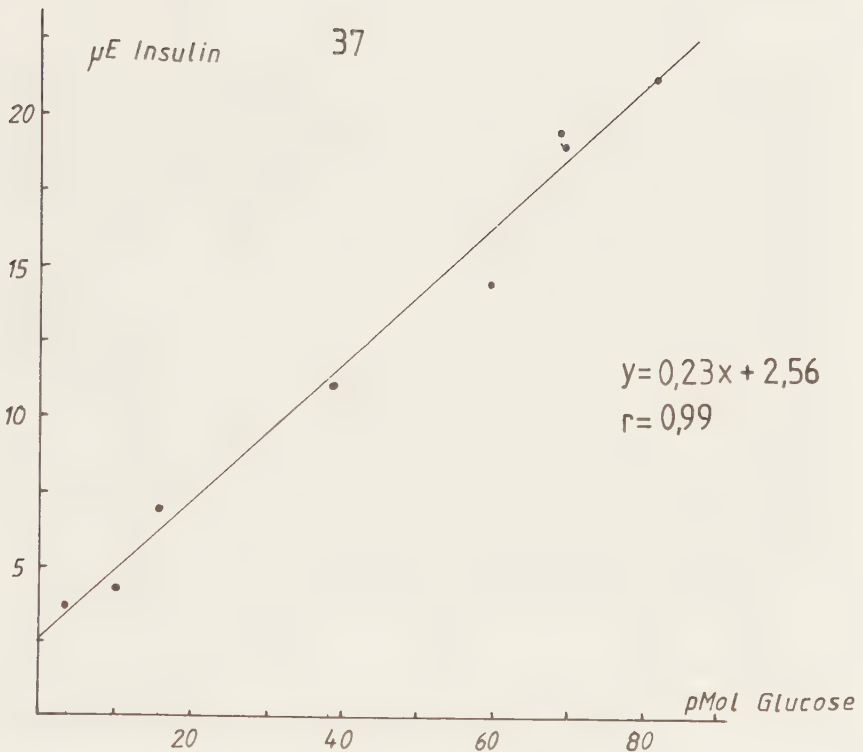


Abb.IV-1 . Korrelation zwischen Insulinsekretion und Glucose-oxidation isolierter Langerhans'scher Inseln

Nach unseren Messungen an Ratteninseln liegt die halbmaximale Stimulierung, i.e. die K_M der CO_2 -Bildung aus uniform markierter Glucose bei 6,6 mM, die CO_2 -Bildung bei maximaler Stimulierung des Systems (v_{max} bei 16,6 mM Glucose) bei 42,5 pMol/Insel/Stunde. Unsere Werte betragen etwa das Doppelte der oxidierten Glucosemenge, die Ashcroft et al.(1970) an isolierten Mäuseinseln fanden (Tab.IV-3).

Wie betont stellt die CO_2 -Bildung aus uniform markierter Glucose ein Maß für den Glucosedurchsatz durch die aerobe Glykolyse, den Citratcyclus (Decarboxylierung von Pyruvat, Oxalosuccinat und α -Ketoglutarat) und den Pentosephosphatweg (Decarboxylierung von 3-Keto-6-Phosphogluconat) dar. Die Enzyme dieser Stoffwechselwege sind nach den Angaben von Trautsohn et al.(1968), Ashcroft und Randle (1970), Matschinsky et al. (1971) und Matschinsky (1972) in Inseln vorhanden.

Keine Angabe kann diese Methode machen über den Glucosedurchsatz über die anaerobe Glykolyse, d.h. über die Lactatbildung, und den Anteil des Pentosephosphatweges am Gesamtglucoseumsatz sowie über die quantitative Bedeutung der Biosynthese von Glykogen, Glucuronat, proteinogenen Aminosäuren und Fettsäuren aus Glucose.

Um den Anteil der Glucoseoxidation am Gesamtglucoseumsatz der Inseln zu ermitteln, muß die Glucoseaufnahme pro Zeiteinheit bestimmt werden. Diese beträgt nach unseren Messungen 0,96 nMol/5 Inseln/180 Minuten bzw. 64 pMol/Insel/Stunde bei einer Glucosekonzentration von 6,6 mM und 1,8 bis 2,4 nMol/5 Inseln/180 Minuten bzw. 120 bis 160 pMol/Insel/Stunde bei einer Glucosekonzentration von 13,3 mM Glucose (Tab. IV-3). Rechnet man diese Werte unter Zugrundelegung eines mittleren Feuchtgewichtes von 30 µg auf Gramm Feuchtgewebe/Stunde um, so ergibt dies Werte von 2 bis 4 µMol/g Feuchtgewicht/Stunde, was in derselben Größenordnung wie im Fettgewebe liegt.

Verknüpft man diese Zahlen mit den CO₂-Bildungsraten, dann beträgt der Anteil der Glucoseoxidation an der Glucoseutilisierung bei 6,6 mM Glucose 22,5 von 64 pMol/Stunde/Insel, also 35% und bei 13,3 mM Glucose 37,5 von 140 pMol/Stunde/Insel (Mittelwert), also 27%.

Auch die Arbeitsgruppe von Phillip Randle in Bristol (Ashcroft et al., 1970, 1973) untersuchte die Glucoseutilisation isolierter Mäuse- und Ratteninseln unter Verwendung einer anderen Methode, bei der die Bildung von ³H₂O aus 5-³H-Glucose bestimmt wird. Da der Stoffwechsel von 5-³H-Glucose zu einem Verlust des Tritiums an Wasser im Triosephosphatisomerase- oder Enolaseschritt führt, gilt die Produktionsrate von tritiiertem Wasser als Parameter für die aerobe und anaerobe Glykolyse und den Pentosephosphatweg (im eigentlichen Sinne für die Phosphoenolpyruvatbildung aus Glucose). Dies müßte nach Auffassung von Steven Ashcroft der Glucoseaufnahme entsprechen, wenn wenig Glucose-6-Phosphat in Glykogen umgewandelt wird, was in Mäuseinseln der Fall sei. Diese Annahme setzt natürlich weiter voraus, daß Glucose sonst auf keinem bekannten oder unbekannten Stoffwechselweg vor den beiden erwähnten enzymatischen Schritten "verlorengeht".

Tabelle IV-3. Glucoseoxidation und -utilisation isolierter Langerhans'scher Inseln

Species	Glucoseangebot (mM)	Stoffwechselrate (pMol/h/ Insel) (µMol/h/ g Trocken- gewicht)		Autoren
<u>Glucoseoxidation</u>				
Maus	4,5 ⁺	4	8	Ashcroft et al. (1970)
	16,7	22	44	
ob/ob- Maus	3,3		7,8	Hellerström und Gunnarsson (1970)
	16,7		30,0	
ob/ob- Maus	3		8,8	Hellman et al. (1971)
	20		63,4	
Ratte	3,3	8,5	1,1 ⁺⁺	diese Arbeit
	16,7	42,5	5,7	
<u>Glucoseutilisation</u>				
Ratte	3,3	28		Snyder et al. (1970)
	16,7	134		
Ratte	6,6	64		diese Arbeit
	13,3	140		
Maus	3,3	13	26	Ashcroft et al. (1972c)
	16,7	89	178	
Ratte	16,7	134		Ashcroft et al. (1972c)
Ratte	3,3	18,3	11,4	Reese et al.(1973)
	16,6	125	78	
	27,8	100	62,5	

⁺Schwellenkonzentration⁺⁺unter Zugrundelegung eines Feuchtgewichtes von 30 µg und damit eines Trockengewichtes von 7,5 µg

Mit Hilfe dieser Methode fanden die genannten Untersucher eine sigmoidale Abhängigkeit der Glucoseutilisation von der Glucosekonzentration im Medium. Eine Konzentrationsänderung von 3,3 auf 16,7 mM Glucose ist mit einem 5fachen Anstieg der Glucoseutilisation verbunden, deren maximale Rate bei Mäusen 89 pMol/Insel/Stunde und bei Ratten 134 pMol/Insel/Stunde beträgt. Unter Berücksichtigung der in Tab.IV-3 angegebenen Werte für die Glucoseoxidation liegt der Anteil der Glucoseoxidation an der Glucoseutilisation bei niedrigem Glucoseangebot bei 31% und fällt bei 16,6 mM auf 20% ab (vgl.unsere Werte für Ratteninseln, S.38).

Dies würde bedeuten, daß bei steigendem Glucoseangebot Glucose nach dem Triosephosphatisomerase- bzw.Enolaseschritt und vor den Decarboxylierungsreaktionen im Citratcyclus vermehrt in einen anderen Stoffwechselweg wie z.B. die Lactatbildung abfließt (siehe später).

Die in Abb.IV-1 gezeigte Beziehung legt zunächst eine enge Verknüpfung zwischen Glucosestoffwechsel und Insulinsekretion nahe, wobei es wahrscheinlicher ist, daß ein Metabolit vor Erreichen des Umwandlungsschrittes von Pyruvat in Acetyl-CoA beteiligt ist, da die CO_2 -Bildung ja bei höheren Glucosekonzentrationen relativ zur Glucoseutilisation abfällt. Man muß sich allerdings vor Augen halten, daß aus der Beobachtung, daß die Inseln mit steigendem Glucoseangebot vermehrt Glucose verstoffwechseln, nicht zwangsläufig geschlossen werden kann, daß daraus die Information zur Sekretion entnommen wird.

Wie die Stimulierung des Glucosestoffwechsels durch ein vermehrtes Glucoseangebot zustandekommt, ist noch unklar. Nach den Arbeiten von Matschinsky und Ellerman (1968) sowie von Ashcroft und Randle (1970) besitzen Inseln eine Hexokinase mit hoher K_M von etwa $7 \cdot 10^{-3} \text{M}$, also in dem Bereich des Glucoseangebotes, was die Stimulierung erklären könnte. Nach neueren Arbeiten (Randle, 1971; Ashcroft et al., 1972a; Matschinsky und Ellerman, 1973) wird jedoch eher dem Transport von Natrium, der den von Glucose begleitet (Cotransport), eine Bedeutung zugeschrieben. Die dadurch erhöhte intracelluläre Natriumkonzentration soll die Na^+/K^+ -ATPase stimulieren, der damit verbundene ATP-Abfall zu einer Aktivierung der Glykolyse führen.

Neben der durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration (von 3,3 auf 16,6 mM) hervorgerufenen Stimulierung der Glucoseutilisation und -oxidation läßt sich ein 50%iger Anstieg des Sauerstoffverbrauches der Inseln nachweisen (Hellerström, 1967), der ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf aufweist (Hellerström und Gunnarsson, 1970). Ein ähnlich sigmoidaler Bezug zur extracellulären Glucosekonzentration wurde auch für die Lactatbildung gefunden (Matschinsky und Ellerman, 1973). Sie berichteten von einer Stimulierung der Lactatabgabe der Inseln von 2,5 auf 78 pMol/Insel/Stunde (entsprechend 1,25 bis 39 pMol Glucoseäquivalenten/Insel/Stunde), wobei allerdings die halbmaximale Stimulierbarkeit bei 16,6 mM und die maximale bei 27,5 mM Glucose lagen, also bei Werten, die stark von unseren und denen anderer Untersucher abweichen.

Besser lassen sich die Werte von Ashcroft et al. (1970) verwenden, die unter den Bedingungen der CO_2 -Bestimmung bei Glucosekonzentrationen von 3,3 bis 16,6 mM Lactatabgaben von 9 bis 29 pMol/Insel/Stunde fanden. Dies entspricht 4,5 bis 14,5 pMol Glucoseäquivalenten/Insel/Stunde bzw. 9 bis 29 μMol Glucoseäquivalenten/g Trockengewicht/Stunde.

Bei einer Glucoseoxidationsrate von 4 bzw. 22 pMol/Insel/Stunde (Tab.IV-3) beträgt damit das Verhältnis von oxidiert zu in Lactat umgewandelter Glucose etwa 1:1 bei 3,3 mM und 1:1,3 bei 16,7 mM. Diese Berechnung belegt die auf S.39 gemachte Überlegung, daß bei höherer Glucosekonzentration weniger Glucose zu CO_2 oxidiert und damit mehr in einen anderen Stoffwechselweg wie die Lactatbildung abgeleitet wird.

Zusammen machen nach den Werten von Ashcroft Glucoseoxidation und Lactatbildung 65% der Glucoseutilisation bei niedriger und etwa 40% bei hoher Glucosekonzentration im Medium aus.

Wir müssen jedoch daraufhinweisen, daß die Messung der Lactatabgabe uns keine Auskunft darüber gibt, ob der Lactatkohlenstoff aus der exogenen Hexose oder aus endogenen Quellen wie Glykogen oder schließlich aus exogenen und endogenen Quellen stammt.

Die Arbeitsgruppe von Bernard Landau in Ohio (Reese et al., 1973) bestimmte deshalb die Bildung von ^{14}C -Lactat und $^{14}\text{CO}_2$ aus uniform markierter Glucose. Sie fanden Glucoseaufnahmen von 18,3 pMol (bei 3,3 mM Glucose) und 125 pMol/Insel/Stunde bei einem Glucoseangebot von 16,6 mM. (vgl. Tab. IV-3). Nach Landaus Berechnungen werden 76% (bei 3,3 mM Glucose) bzw. 62% (bei 16,6 mM Glucose) der aufgenommenen Glucose in Lactat bzw. CO_2 umgewandelt, wobei - im Gegensatz zu den bisher diskutierten Untersuchungen - der Abbau von Glucose vorwiegend über Pyruvat und den Citratcyclus und weniger über die Lactatbildung erfolgen soll. Offen bleibt damit aber die Frage, welches Stoffwechselschicksal die verbleibenden 24 bzw. 38% Glucose haben. Zumindest ein Teil dieser Glucose könnte für die Biosynthese von nichtessentiellen Aminosäuren verwendet werden, deren Anteil im Rinderpro-insulin etwa 60% beträgt.

Aus den besprochenen Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung des Glucosestoffwechsels von Inseln und deren Ergebnissen ist nicht zu entnehmen, ob in der Glykolyse, im Pentosephosphatweg oder Citratcyclus ein Signalmolekül für die Insulinsekretion - wie es die Metabolithypothese fordert - gebildet wird, da sowohl die CO_2 -Bildung, der O_2 -Verbrauch wie auch die Lactatbildung ja immer nur Messungen von Endprodukten oder Umsätzen in einzelnen Stoffwechselabschnitten. Wir stehen damit vor dem Problem des "schwarzen Kastens", bei dem wir bisher nur die Eingangs- und Ausgangsgrößen (Glucoseaufnahme bzw. Insulin-, CO_2 - und Lactatabgabe) bestimmt haben. Um der Lösung unserer Fragestellung einen Schritt näher zu kommen, muß außer den Ein- und Ausgangsgrößen des schwarzen Kastens auch der Inhalt desselben genauer untersucht werden.

Damit ein Stoff als Triggermolekül dienen kann, sollte vor der Sekretion des Insulins eine ausreichende Änderung des Spiegels eines derartigen Metaboliten (oder auch mehrerer) auftreten. Da auch die Insulinsekretion quantitative Unterschiede aufweist, müßte man zusätzlich fordern, daß entsprechend die Metabolitspiegel quantifiziert sind.

Untersuchungen von Metabolitspiegeln wurden erstmalig Ende der Sechziger Jahre an isolierten Inseln in vitro und in

Frierstopppexperimenten an Maus- und Rattenpankreatata durchgeführt, die in vivo erhöhten Glucosespiegeln ausgesetzt waren (Matschinsky und Ellerman, 1968).

Matschinsky und Ellerman (1968) fanden bei ihren Untersuchungen isolierter Inseln von ob/ob-hyperglykämischen Mäusen einen 400%igen Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Konzentration innerhalb von 30 Sekunden. Diese Befunde konnte Matschinsky einige Jahre später bei Studien an Ratteninseln nicht mehr bestätigen: er fand keine Änderungen der Gewebsspiegel von Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat, ATP oder Phosphokreatin innerhalb von 1 bis 5 Minuten nach Glucosegabe (Matschinsky et al., 1972). Außerdem traten in anderen Experimenten Metabolitspiegeländerungen zwar schnell auf, waren aber nicht von einer Insulinfreisetzung begleitet (Matschinsky et al., 1971).

Ashcroft et al. (1970) hatten in ihren schon mehrfach zitierten Untersuchungen an Mäuseinseln eine Erhöhung der Glucose-6-Phosphat-Konzentration in Abhängigkeit von der extracellulären Glucosekonzentration gefunden, die einen sigmoidalen Verlauf zeigte und nach 15 Minuten ein Plateau erreichte. Später wandte sich Ashcroft auch der Untersuchung der Pankreatata von Ratten zu und verglich deren Verhalten auf eine Glucoseerhöhung im Medium mit dem von Mäuseinseln: dabei ergab sich bei einer Steigerung der Glucosekonzentration von 2,8 auf 18,9 mM bei Mäuseinseln eine schnelle Änderung der Glucose-6-Phosphat-Konzentration und eine Erhöhung der Spiegel von Fructose-1,6-Bisphosphat und Triosephosphaten nach 2 Minuten, während bei Ratteninseln keine Änderung der Glucose-6-Spiegel und kein Anstieg der Fructose-1,6-Bisphosphat- und Triosephosphatkonzentration nach 5 Minuten zu verzeichnen war. Offenbar liegen hier Speciesunterschiede zwischen Ratten und Mäusen vor. (Ashcroft et al., 1973). Nach diesen Befunden ist die Frage nach wie vor nicht sicher geklärt, ob konzentrationsmäßig und zeitlich ausreichende Änderungen von Metabolitspiegeln, die den sekretorischen Prozess in Gang setzen könnten, in den Inseln auftreten. Hinzukommt, daß nicht unbedingt der Spiegel eines Metaboliten verändert sein muß, sondern auch die Flußrate eine Änderung erfahren könnte.

Bedeutung des Pentosephosphatweges für die glucoseinduzierte Insulinsekretion

Seit den Arbeiten von Harry Keen in London (Keen et al., 1965; Jarrett und Keen, 1968), nach denen Inseln mehr CO_2 aus 1C^{14} -Glucose als aus 6C^{14} -Glucose bilden, war bekannt, daß Glucose in Inseln auch über den Pentosephosphatweg umgesetzt wird. Da auch die 6-Phosphogluconat-Konzentration einen sigmoidalen Bezug zur extracellulären Glucosekonzentration aufweist, schrieb man dem Pentosephosphatweg eine größere Bedeutung für die Insulinfreisetzung zu (Montague und Taylor, 1968).

Wir maßen deshalb die CO_2 -Bildung aus spezifisch in Position 1 und 6 markierter Glucose in Abhängigkeit vom Glucoseangebot im Medium. Dabei erhielten wir denselben Kurvenverlauf wie mit uniform markierter Glucose. Die CO_2 -Bildung aus C1-markierter Glucose liegt höher als die aus C6 markierter Hexose, wobei allerdings die CO_2 -Bildung aus C6 markierter steiler als die aus C1 markierter Glucose ansteigt: der Quotient von C1 zu C6 - Oxidation sinkt von 2 bis 2,4 auf 1,4 ab.

Nach der Publikation der Arbeitsgruppe von Joseph Katz in Los Angeles (Wood et al., 1963) müssen zur Berechnung des Anteils des Pentosephosphatweges (Bilanz: Glucose $\rightarrow$ Glucose-6-Phosphat $\rightarrow$ Glycerinaldehyd-3-Phosphat + 3 CO_2) am Gesamtglucosestoffwechsel folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. der Glucosestoffwechsel, der nicht zu den Triosephosphaten führt, muß gering sein im Vergleich zum Pentosephosphatweg und zur Glykolyse,
2. Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat müssen im chemischen und Isotopengleichgewicht stehen,
3. Triosephosphate dürfen nicht in Fructose-6-Phosphat rückverwandelt werden,
4. es muß ein Isotopengleichgewicht (steady state) vorliegen und
5. es dürfen keine Pentosephosphate vor der Umsetzung durch die Enzyme Transketolase und Transaldolase aus dem Pentosephosphatweg fließen (d.h. vor allem D-Ribose-5-Phosphat).

Bis auf die 2. und die 3. Voraussetzung, daß in Inseln keine Gluconeogenese stattfindet (Trauttschold et al., 1968), sind die erforderlichen Bedingungen für Inseln nicht bewiesen.

Wir wissen nicht genau, wieviel Glucose-6-Phosphat in die Glykogen- und Nucleinsäuresynthese fließt und nur wenig oder zu wenig über andere Umsetzungsmöglichkeiten der Glucose. Unsere Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlüsse dürfen deshalb nur unter Vorbehalt verwendet werden, bis die Gültigkeit der erforderlichen Annahmen für Inseln bewiesen ist.

Mit Hilfe der von Wood et al. (1963) angegebenen Formel

$$\frac{G_1CO_2 - G_6CO_2}{1 - G_6CO_2} = \frac{3 P}{1 + 2 P} \quad \text{läßt sich}$$

der Anteil des Pentosephosphatweges am Gesamtglucosestoffwechsel berechnen. Dabei sind G_1CO_2 und G_6CO_2 die spezifischen $^{14}CO_2$ -Bildungsraten (in %) aus ^{14}C -1-Glucose bzw. ^{14}C -6-Glucose und P der prozentuale Anteil des Pentosephosphatweges am Gesamtglucosestoffwechsel.

Wie die in Tab.IV-4 zusammengestellten Berechnungen zeigen, fällt der Anteil des Pentosephosphatweges am Glucosestoffwechsel mit steigendem Glucoseangebot und damit -utilisation ab.

Tabelle IV-4. Prozentualer Anteil des Pentosephosphatweges am Gesamtglucosestoffwechsel bei steigenden Glucosekonzentrationen

Glucosekonzentration im Medium (mM)	6,6		13,3	
Glucose 1- ^{14}C oder Glucose 6- ^{14}C	1	6	1	6
Glucose- ^{14}C abgebaut zu $^{14}CO_2$ (pMol/Insel/Stunde)	20	11,3	29,5	25,5
Glucoseutilisation (pMol/Insel/Stunde)	64		140	
Spezifische CO_2 -Bildung in % (= Verhältnis von abgebauter Glucose zur Glucoseutilisation)	31,3	17,7	21,1	17,9
Relativer Pentosephosphatweganteil an der Gesamtutilisation (in %)	6,2		0,72	
Relativer Anteil der Glucoseoxidation an der Glucoseutilisation (in %)	35		27	

Subtrahiert man die für den Pentosephosphatweg gefundenen Werte (6,2 bzw. 0,72%) von der - in Tab.IV-4 zur Erinnerung ebenfalls mit angeführten - Gesamt-CO₂-Bildung, bei den entsprechenden Glucosekonzentrationen, so zeigt sich, daß die Glucoseoxidation über den Citratcyclus bei steigender Glucosekonzentration nur ganz geringfügig abfällt (von 28,8 auf 26,38 %).

Vergleicht man bei aller Vorsicht gegenüber derartigen Berechnungen, deren Voraussetzungen wie bereits diskutiert nicht hinreichend abgesichert sind, unsere Werte mit denen anderer Autoren, so finden sich weitgehende Übereinstimmungen: Peter Snyder in Boston berechnete einen Anteil von 6% bei 3,3 mM und 0,8 % bei 16,6 mM Glucose (Snyder et al., 1970), Steven Ashcroft einen prozentualen Anteil des Pentosephosphatweges von 11 bei 2,8 mM und von 1,9 bei 18 mM (Ashcroft et al., 1972b) (siehe auch Landau, 1972).

Geht man davon aus, daß für die potentielle Bedeutung eines Stoffwechselweges für die Insulinsekretion der quantitative Substratdurchsatz entscheidend ist - was unserer Auffassung nach nicht zwingend gegeben sein muß (siehe Abschnitt Receptor- versus Metabolithypothese) - dann kommt dem Pentosephosphat wohl keine Bedeutung zu.

Dann müßte der von Matschinsky und Ellerman (1968) gefundene Anstieg des 6-Phosphogluconatspiegels in Inseln nach einer Hyperglykämie eher auf eine Hemmung des Pentosephosphatweges in einem der 6-Phosphogluconatbildung folgenden Schritt als auf einen erhöhten Durchsatz durch diesen Stoffwechselweg zurückzuführen sein.

Einfluß von Effektoren der glucoseinduzierten Insulinsekretion auf die Glucoseoxidation

Um die Bedeutung der Glucoseoxidation für die glucoseinduzierte Insulinsekretion weiter zu erforschen, schien es sinnvoll zu untersuchen, ob Stoffe, die die Insulinsekretionsrate verändern wie z.B. Theophyllin oder Sulphonylharnstoffe, auch Änderungen der Glucoseoxidationsrate hervorrufen. Ein derartiges Ergebnis könnte als Hinweis dafür gewertet werden, daß die Glucoseoxidation direkt mit dem sekretorischen Prozess verknüpft ist.

Wegen der allgemeinen Bedeutung von cyclischem AMP für sekretorische Prozesse untersuchten wir die Wirkung von Theophyllin, einem Hemmstoff der Phosphodiesterase. Dieses Methylxanthin, das in vivo die Insulinfreisetzung fördert (Turtle et al., 1967), stimuliert auch in vitro in einer Konzentration von 10^{-3} M die Sekretion von Insulin.

Da eine sigmoidale Abhängigkeit der Insulinsekretionsrate von der angebotenen Glucosemenge existiert, muß die Wirkung von Effektoren auf die Insulinsekretion zu ihrer genauen Charakterisierung bei allen Glucosekonzentrationen untersucht werden.

So findet sich denn eine deutliche Stimulierung der Insulinsekretion durch Theophyllin auch erst ab Glucosekonzentrationen von 6 bis 7 mM (permissiver Effekt der Glucose, S.35). Da Theophyllin die Maximalgeschwindigkeit des sigmoidalen Bezuges von Glucoseangebot zu Insulinsekretion stimuliert, spricht man von einem $v_{\max}$ -Effekt dieses Methylxanthins. Daß die Wirkung von Theophyllin über eine intracelluläre Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels vermittelt wird, wurde erstmalig durch Sussman und Vaughan (1967) nachgewiesen, die am perfundierten Pankreas zeigen konnten, daß dibutyryl-Cyclo-AMP die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit von einer Schwellenkonzentration an Glucose stimuliert. Später konnten Ashcroft et al. (1972b) und Sams und Montague (1972) eine Hemmung der Phosphodiesterase durch Theophyllin in Extrakten von Pankreasinseln nachweisen.

Auch in unserem System war ein Effekt von db-cyclo-AMP auf die Insulinsekretion nachweisbar, der allerdings bei gleicher Konzentration geringer als der des Theophyllins war. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß Theophyllin außer seinem Einfluß auf die cyclo-AMP-Bildung noch einen Nebeneffekt besitzt, der zu einer vermehrten Wirkung gegenüber dem diacylsubstituierten Cyclo-AMP-Derivat führt. Andererseits könnte man die stärkere Wirkung des Theophyllins darauf zurückführen, daß die Phosphodiesterase (n) durch diesen Stoff für längere Zeit gehemmt wird (werden), während das zugesetzte db-Cyclo-AMP dem Abbau durch die - in diesem Fall nicht gehemmte - Phosphodiesterase (n) anheimfällt.

Ähnliche Befunde wurden von Helmut Schatz (Ulm) bei Untersuchungen der Theophyllinwirkung an isoliert inkubierten Mäuseinseln erhoben, bei denen Theophyllin und Cyclo-AMP in Konzentrationen von jeweils 10 mM die Insulinsekretion in Abhängigkeit von einer Mindestglucosekonzentration stimulierten (Schatz et al., 1973).

Sollten Theophyllin und db-cyclo-AMP ihre Wirkung über einen erhöhten Glucosestoffwechsel entfalten, so wären theoretisch mehrere Wirkungsmechanismen denkbar: zum einen wäre eine vermehrte Glucoseaufnahme in die β -Zelle denkbar, zum anderen eine vermehrte intracelluläre Glucosebildung durch eine durch Proteinkinasen vermittelte Aktivierung des Glykogenabbaues. Auch die Aktivität anderer Enzyme des Glucosestoffwechsels könnte durch Proteinkinasen, die von Cyclo-AMP aktiviert werden, beeinflusst werden. Ein derartiger Effekt müßte aber eher zu einer Linksverschiebung des sigmoidalen Bezuges von Glucoseangebot und Insulinfreisetzung führen, wäre also ein K_M -Effekt.

Einen anderen Wirkungsmechanismus nahm man für die Sulphonylharnstoffe an, die in vivo die Blutglucosekonzentration senken und gleichzeitig zu einem Anstieg des Seruminsulinspiegels führen (Übersicht bei Grodsky, 1970), da sie an Schnitten der Bauchspeicheldrüse, vor allem des Kaninchenpankreas, auch in Abwesenheit von Glucose wirken (Coore und Randle, 1964).

Im Gegensatz dazu konnten wir an isolierten Inseln von Maus und Ratte keine Wirkung von Sulphonylharnstoffen in Abwesenheit von Glucose feststellen. Auch hier ließ sich der erste signifikante Effekt erst bei Glucosekonzentrationen von über 7 mM nachweisen; die geringste, noch wirksame Dosis liegt bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ Glibenclamid (Löffler et al., 1969).

Im Gegensatz zu ihrer Wirkung auf die Insulinsekretion besitzen Theophyllin und db-cAMP bei allen untersuchten Glucosekonzentrationen keinen Effekt auf die Glucoseoxidationsrate isoliert inkubierter Inseln (Abb.III-6, S.27). In ähnlicher Weise ist auch Glibenclamid nicht in der Lage, die Geschwindigkeit der Glucoseoxidation gegenüber der Kontrolle zu verändern (Tab.III-1, S.28).

Nach diesen Befunden ist es unwahrscheinlich, daß die genannten Effektoren über eine Änderung der Glucoseoxidationsrate wirken. Man muß allerdings noch berücksichtigen, daß nicht nur die absolute, sondern auch die relative Oxidationsrate wichtig wichtig ist. Denn es könnte ja sein, daß diese Effektoren die Glucoseutilisation verändern, die Glucoseoxidationsrate dagegen unbeeinflusst lassen, sodaß sich damit der relative Anteil - z.B. auf Kosten einer veränderten Lactatbildung - ändert.

Ashcroft et al. (1972b) fanden jedoch keinen Einfluß von Glibenclamid auf die Glucoseutilisation von Inseln.

Die Wirkung von cyclischem AMP in Inseln ist nach wie vor ungeklärt. Diskutiert wird u.a. eine Veränderung der sub-cellulären Calciumverteilung (Malaisse, 1975). Dasselbe gilt auch für die Sulphonylharnstoffe, die nach den Forschungen von Ashcroft et al. (1972c) und Sams und Montague (1972) zwar die Phosphodiesterase, ein intracelluläres Enzym, hemmen, aber nach Angaben von Hellman und Täljedal (1975) ihre Wirkung an der Außenoberfläche der Plasmamembran entfalten sollen. Auch den Sulphonylharnstoffen wird eine Wirkung auf den Calciumstoffwechsel der Inseln zugeschrieben.

Das Benzothiazidinderivat Diazoxid ist bei Mensch und Tier diabetogen. Seine Wirkung beruht offenbar auf seinem deutlichen Hemmeffekt auf die Insulinfreisetzung. Diese Hemmwirkung (Tab.III-1, S.28) ist durch Theophyllin, also durch eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels, nicht aufhebbar. Daß im Gegensatz dazu Glibenclamid die Diazoxidwirkung auf die Insulinsekretion aufheben kann, spricht gegen die angeführte Hypothese, nach der auch die Sulphonylharnstoffe über das Adenylatcyclase/Phosphodiesterase-System in Inseln wirken. Diese Beeinflussung der Insulinabgabe von Inseln durch Diazoxid allein oder in Kombination mit Theophyllin bzw. Glibenclamid ist - wie im Falle von Theophyllin und db-cAMP - nicht von Änderungen der Glucoseoxidationsrate begleitet (Tab.III-1, S.28).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Wirkung dieser Effektoren der Insulinfreisetzung nicht über eine Änderung der Glucoseoxidationsrate gegenüber der bei glucoseinduzierter Insulinfreisetzung hervorgerufen wird.

Nach wie vor offen bleibt damit aber auch die Frage, über welchen Mechanismus - Receptor- oder Metabolitvermittelt - die glucoseinduzierte Insulinsekretion erfolgt, da alle erwähnten Effektoren nur in Gegenwart von einer Schwellenkonzentration an Glucose wirksam waren.

Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation

Aus diesem Grunde wandten wir uns der Untersuchung der Wirkung von Glykolyseinhibitoren (Fluorid und Jodacetat) auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation zu. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß eine über einen Receptor für Glucose vermittelte Insulinsekretion durch eine Hemmung der Glykolyse unbeeinflußt bleiben müßte.

Die Hemmung des Glykolyseenzym Enolase durch Fluorid - in Gärungs- und Muskelsäften in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-3}$ bis $10^{-2}M$ - ist seit den Arbeiten von Otto Meyerhof in Berlin bekannt (Lohmann und Meyerhof, 1934; Meyerhof, 1935; Meyerhof und Schulz, 1938). Schon 1890 hatte I. Effront in Paris entdeckt, daß sich die Gärung durch Fluorid hemmen läßt. Setzt man gärender Flüssigkeit Fluorid zu, so häuft sich Phosphoglycerinsäure an, das Substrat der Enolasereaktion; unter diesen Versuchsbedingungen hatte Nielson 1930 erstmalig die Phosphoglycerinsäure beschrieben. Otto Warburg und Walter Christian (1942) untersuchten Anfang der Vierziger Jahre in Berlin die Wirkung von Fluorid auf das gereinigte Enzymprotein. Dabei fanden sie, daß Fluorid Magnesium am Enzym verdrängt, aber nicht durch Salzbildung, sondern durch Bildung eines Magnesium-Fluoro-Phosphat-Komplexes. Da neben Fluorid auch Magnesium und Phosphat beteiligt sind, wird die Fluoridwirkung auch durch die Konzentration von Magnesium und Phosphat bestimmt.

Setzt man im Inselexperiment Fluoridkonzentrationen von 10^{-4} bis $10^{-2}Mol/Liter$ ein, so sinkt die Glucoseoxidationsrate von 25 bei der Kontrolle ohne Fluorid auf etwa 4,7 $pMol/Insel/Stunde$ bei 10^{-3} und $10^{-2}M$ Fluorid (entspricht etwa 20% des Ausgangswertes). Gleichzeitig sinkt die Insulinsekretionsrate auf etwa 57% ab. Experimente mit $10^{-5}M$ Fluorid wurden nicht durchgeführt, da Fluorid in dieser Konzentra-

tion - zumindest beim Menschen - physiologisch im Blut vorhanden ist.

Pipeleers und Malaisse (1973) berichten in einer kurzen Abstractmitteilung von einem geringen Hemmeffekt von Fluorid ($2 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3} M$) auf die Insulinsekretion isolierter Inseln, der durch Zugabe von Pyruvat, Fumarat und Glutamat (in Konzentrationen von jeweils 5 mM) wieder aufhebbar war.

Dagegen konnte H. Aleyassine (Canada) bei seinen Untersuchungen an Pankreasschnitten von Ratten keinen Effekt von $2 \cdot 10^{-3} M$ Fluorid in Gegenwart niedriger (1,65 mM) und hoher (16,5 mM) Glucosekonzentrationen nachweisen (Aleyassine, 1970). Die an Pankreasschnitten nicht nachweisbare Wirkung von Fluorid dürfte auf das Versuchsmodell zurückzuführen sein, in dem Fluorid offenbar nicht in ausreichenden Mengen an die Inseln gelangt. Dies würde den eingangs erwähnten Vorteil der isoliert inkubierten Insel gegenüber anderen experimentellen Anordnungen belegen.

Die Hemmung der Glucoseoxidation ist mit einer Hemmung der Enolasereaktion erklärbar, daneben könnten aber auch andere Magnesiumabhängige Enzyme inhibiert werden, da Magnesium an allen Reaktionen teilnimmt, bei denen Phosphatgruppen übertragen werden, weil das Substrat dieser Enzyme nicht ATP, sondern der $ATP^{2-}Mg$ -Komplex darstellt.

Daß bei einer Konzentration von $10^{-2} M$ Fluorid die Insulinsekretion nur auf etwa 60%, die Glucoseoxidation aber auf 20%, wurde von uns 1972 (Löffler et al., 1972) und später von Matschinsky (1972) als Hinweis für die Receptorhypothese gewertet. Streng genommen dürfte aber, wäre nur die Wechselwirkung mit dem Receptor entscheidend, die Sekretion überhaupt nicht gehemmt sein. Die Substrat- und Energieversorgung der Inseln war ja durch Inkubation mit Pyruvat und Glutamat gewährleistet. Es ist andererseits jedoch nicht auszuschließen, daß sich durch die drastische Hemmung der Glucoseoxidation Metaboliten derart anhäufen, daß sie einen störenden Effekt auf die Ausschleusung des Insulins aus der Zelle ausüben. Außerdem könnte die Reduktion der Insulinfreisetzung auch dadurch bedingt sein, daß Fluorid mit dem für die Insulinfreisetzung notwendigen Calciumion ein schwer lösliches Salz (CaF_2) bildet. Schon Krebs und Henseleit hatten in der Mitteilung, in der sie erstmalig ihren Puffer beschrieben (1932)

darauf hingewiesen, daß durch Entweichen von Kohlensäure Trübungen von Magnesium- und Calciumniederschlägen auftreten können. Nach Grodsky und Bennett (1966a,b) und Malaisse (1969) ist eine Mindestkonzentration von 10^{-3}M für die Insulinsekretion erforderlich. Die Glucoseoxidation isolierter Inseln bleibt dagegen im calciumfreien Medium unbeeinträchtigt (Ashcroft et al., 1970).

Nach Seel (1965) beträgt das Löslichkeitsprodukt von CaF_2 in reiner wässriger Lösung bei Zimmertemperatur $10^{-10,46}$. Die Calciumkonzentration in dem von uns verwendeten Puffer liegt bei $2,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$. Die Konzentration an Fluorid, bei der das Löslichkeitsprodukt bei der gegebenen Calciumkonzentration noch nicht überschritten wird, errechnet sich folgendermaßen:

$$\begin{aligned} K_{\text{CaF}_2} &= 10^{-10,46} = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{F}^-]^2 \\ [\text{F}^-]^2 &= \frac{10^{-10,46}}{2,5 \cdot 10^{-3}} \\ &= \frac{4 \cdot 10^{-10,46}}{10 \cdot 10^{-3}} \\ &= 4 \cdot 10^{-8,46} \\ [\text{F}^-] &= 2 \cdot 10^{-4,23} \\ \text{da } \log 2 &= 0,3 \\ [\text{F}^-] &= 10^{-3,93} \text{ Mol/Liter} \end{aligned}$$

Das heißt, damit Fluorid mit Calcium als schwerlösliches Calciumfluorid ausfällt, muß eine Fluoridkonzentration von $10^{-3,93}\text{M}$ überschritten werden. Dies ist in den Experimenten mit 10^{-3} und 10^{-2}M Fluorid der Fall.

In welchem Ausmaß das Löslichkeitsprodukt überschritten wird, ergibt sich durch die Gleichung:

$$\begin{aligned} [\text{Ca}^{2+} - x] \cdot [\text{F}^- - 2x]^2 &= 10^{-10,46}, \text{ wobei } x \text{ die Menge} \\ &\text{der ausgefällten Calcium- bzw. Fluoridionen darstellt. Bei} \\ &\text{einer Fluoridkonzentration von } 10^{-2}\text{M gilt demnach} \\ [2,5 \cdot 10^{-3} - x] \cdot [10^{-2} - 2x]^2 &= 10^{-10,46} \end{aligned}$$

Durch Nähungsverfahren ergibt sich, daß bei dieser Fluoridkonzentration das gesamte Calcium ausgefallen ist.

Diese Berechnungen gelten für reine wässrige Lösungen, in denen sich bei Zimmertemperatur nur Calcium- und Fluoridionen befin-

den. Unsere Versuche wurden jedoch bei 37°C (Erhöhung der Löslichkeit!) mit einem Puffer durchgeführt, der eine Reihe von Fremdsalzen ($\text{Mg}^{++}, \text{Na}^{+}, \text{K}^{+}, \text{SO}_4^{--}, \text{HCO}_3^{-}, \text{Cl}^{-}, \text{HPO}_4^{-}$) und zudem noch ein Makromolekül (das auch Calcium bindet) und biologisches Gewebe enthält. Damit liegen eine Reihe von Gleichgewichten zwischen Ionen bzw. Ionen und Albumin nebeneinander in Lösung vor, die das Gleichgewicht Calcium/Fluorid beeinflussen können.

Eigene Untersuchungen mit einer calciumsensitiven Elektrode haben so auch gezeigt, daß die Konzentration an freien Calciumionen in einem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit und ohne Albuminzusatz durch Zugabe von Natriumfluorid (10^{-3} M) nicht beeinflußt wird.

Nach Montague und Howell (1973) stimuliert Fluorid in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ maximal die Adenylatcyclase von Membranfragmenten von Langerhans'schen Inseln. Man könnte daraus schließen, daß bei einer Gültigkeit der Metabolithypothese eine Hemmung der Glucoseoxidation eine entsprechende Hemmung der Insulinsekretion nach sich zieht, die jedoch durch die fluoridinduzierte Stimulierung der cyclo-AMP-Bildung - was die Insulinfreisetzung unabhängig vom Stoffwechsel fördert - überkommen wird. Nach den Untersuchungen von K.D.Hepp (Hepp, persönliche Mitteilung) kommt der Fluorideffekt auf die Adenylatcyclase jedoch nicht an intakten Zellen zum Tragen, sodaß wir diesen Mechanismus ausschließen können.

Das Essigsäurederivat Monojodacetat ($\text{JCH}_2\text{COO}^{-}$) wirkt über die Blockade von Sulfhydrylgruppe durch nucleophile Substitution. Die Hemmung der Glykolysekette kommt über eine Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase zustande. Dieses Enzym enthält 15 SH-Gruppen, von denen bei Zugabe von Jodacetat - am gereinigten Enzymprotein - 5 durch Carboxymethylierung blockiert werden.

Der Einsatz von $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Jodacetat in Inselinkubationen bewirkt eine Hemmung der Glucoseoxidation auf 12% gegenüber der Kontrolle mit 13,3 mM und eine Hemmung der Insulinsekretion auf 63% des Ausgangswertes. Dieser Effekt entspricht etwa der mit Fluorid in einer Konzentration von 10^{-2} M erzielten Wirkung.

Dagegen ist in der Arbeit von Aleyassine (1970) kein Effekt von 10^{-4}M Jodacetat auf die Insulinsekretion beschrieben, was wiederum auf die Verwendung von Pankreasschnitten zurück zuführen sein könnte.

Die Arbeitsgruppe von Karl Sussman in Denver (Georg et al., 1971) untersuchte an isolierten Inseln und am isoliert perfundierten Pankreas der Ratte die Wirkung von 5,6 mM Glucose in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Jodacetat: sie berichten außer einem Abfall der Insulinsekretionsrate auf etwa 4% (am perfundierten Pankreas) eine Erhöhung der Spiegel von Glucose-6-Phosphat, Fructose-1,6-Bisphosphat sowie einen Abfall der ATP-Konzentration (in unter gleichen Bedingungen inkubierten Inseln). Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, daß Jodacetat die Glykolyse hemmt, aber gleichzeitig nicht ausgeschlossen, daß dieses alkylierende Agens auch mit SH-Gruppen an der Zelloberfläche reagiert und dort einen spezifischen Glucosereceptor blockiert. Aus der Beobachtung, daß die ATP-Konzentration in den Inseln durch Pyruvat in einer Konzentration von 10 mM wieder restituiert werden kann, schließen die Autoren vorsichtig, daß dem ATP zwar eine permissive Funktion zukomme, daß aber entscheidend die Glykolyse jenseits des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Schrittes sei.

Bo Hellman und seine Gruppe in Umeå⁹ untersuchten - unter Hinweis auf unsere Berichte - die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit (10^{-6} bis 10^{-3}M) der Wirkung von Jodacetamid, dem Säureamid von Jodacetat, auf Inseln von ob/ob-Mäusen, deren Inseln mehr als 90% β -Zellen enthalten, und von normalen Tieren in Gegenwart von Glucose (Hellman et al., 1973, 1974). Nach ihren Untersuchungen ist Jodacetamid sowohl ein Hemmstoff als auch überraschenderweise ein Potentiator der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Bei Experimenten mit isoliert inkubierten Inseln fanden sie bei Jodacetamidkonzentrationen von 10^{-4}M eine Stimulierung, von $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ keinen Einfluß und von 10^{-3}M eine Hemmung der Insulinsekretion über 60 Minuten. Untersucht man diese Konzentrationsabhängigkeit an perfundierten Inseln und bestimmt gleichzeitig eine Zeitabhängigkeit, so beobachtet man, daß Jodacetamid in einer Konzentration von 10^{-4}M über 2 Stunden einen stimulierenden Effekt auf die Insulinfreisetzung hat, während der initiale stimulierende Effekt von $3 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-3}M nach 60 bzw. 15

Minuten kontinuierlich wieder abfällt.

Der Nettoeffekt dieser beiden Wirkungen hängt also von der Inkubationsdauer, der Konzentration von Jodacetamid und der Glucosekonzentration ab. Die initiale stimulierende Wirkung von Jodacetamid auf die Insulinsekretion - allerdings nur bei Glucosekonzentrationen von über 3 mM - soll durch eine Wechselwirkung dieses Thiolreagens mit SH-Gruppen der Zelloberfläche, der später auftretende hemmende Einfluß über eine Hemmung der Glucoseoxidation zustandekommen: bei Jodacetamidkonzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M fand sich in Gegenwart von 10 mM Glucose kein signifikanter Effekt, bei 10^{-6} M eine leichte Stimulierung und bei 10^{-3} M eine drastische Hemmung der Glucoseoxidation von 28,3 auf 4,7 μ Mol oxidierte Glucoseäquivalente/g Insel trockengewicht/Stunde. Gleichzeitig war bei einer Konzentration von 10^{-4} M der Spiegel von Fructose-1,6-Bisphosphat unverändert und von $5 \cdot 10^{-4}$ M auf das 20fache erhöht; über die Veränderung bei einer Konzentration von 10^{-3} M, bei der die drastische Reduktion der Insulinsekretion eintritt, sind keine Angaben gemacht. Die Glucoseaufnahme wird durch Jodacetamid in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-3} M nicht beeinflusst. Aus diesen Untersuchungen kann nicht abgeleitet werden, ob Glucose die Insulinsekretion über einen Metaboliten oder direkt über einen Membranreceptor stimuliert. Sie machen aber deutlich, wie wichtig die Bestimmung von Zeitabhängigkeiten für die Interpretation derartiger experimenteller Studien ist.

Auch Malaisse berichtete über Untersuchungen mit Glykolyseinhibitoren an isoliert inkubierten Inseln (Pipeleers und Malaisse, 1973): in einer Konzentration von 10^{-3} M Jodacetat die glucoseinduzierte Insulinsekretion stark, bei 10^{-4} M findet sich nur ein schwacher Hemmeffekt (keine quantitativen Angaben).

Matschinsky und Ellerman (1973) untersuchten den Einfluß von Jodacetat auf die Lactatbildung von Inseln. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ M kommt es zu einer fast vollständigen Blockade der sigmoidalen Abhängigkeit der Lactatbildung von der extracellulären Glucosekonzentration, auf die wir schon auf S. 41 eingegangen waren. Im Gegensatz dazu ist die Insulin-

freisetzung in Gegenwart von 0,2 mM Jodacetat nicht gehemmt, allerdings nur in Gegenwart von 5 mM ^{Pyruvat} (bei 100minütiger Perifusion). Die Perifusion mit pyruvatfreier Lösung führt dagegen zu einer jodacetatabhängigen Hemmung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung.

Andrerseits stimulieren die nichtverstoffwechselbaren Zucker 3-O-Methylglucose und Galactose zwar die Lactatbildung von Inseln, rufen aber keine Sekretion hervor. Matschinsky führt die Stimulierung der Lactatbildung auf den zusätzlichen Energiebedarf zurück, der mit dem Cotransport von Natrium beim Zuckertransport in die Inseln auftritt.

Später studierte Matschinsky's Arbeitsgruppe - unter Hinweis auf unsere Arbeiten - den konzentrationsabhängigen Einfluß von Jodacetat und Jodacetamid auf den Glucosestoffwechsel und die Insulinsekretion, in diesem Fall die durch Aminosäuren induzierte, die nur in Gegenwart einer Schwellenglucosekonzentration auftritt (Pagliara et al., 1975). Als Parameter für den Glucosestoffwechsel dient die Lactatgabe. In Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ bis $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ blockieren Jodacetat und Jodacetamid die Glykolyse vollständig. Gleichzeitig störte Jodacetat in dieser Konzentration die permissive Funktion von Glucose auf die aminosäureninduzierte Insulinsekretion nicht. Dagegen führt Jodacetamid in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, bei der die Lactatproduktion nicht verändert war, zu einer wesentlichen Veränderung der Insulinsekretion: Aminosäuren riefen jetzt auch in Abwesenheit von Glucose eine Sekretion hervor und die durch 5 mM Glucose induzierte Insulinsekretion war wesentlich verstärkt. Diese Wirkung soll - wie schon von Hellman diskutiert - durch Wechselwirkung von den SH-Reagentien mit membranständigen SH-Gruppen zustandekommen. Matschinsky sieht diese Ergebnisse als weitere Stütze für die Rezeptorhypothese.

Außerdem untersuchten wir die Wirkung von Cyanid, einem Hemmstoff von Cytochrom aa_3 in den Mitochondrien, auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation. Bei einer Konzentration von 10^{-3}M werden beide Prozesse auf 10% gehemmt. Einen ähnlichen Befund erhob Aleyassine (1970) an Pankreasschnitten, der bei der gleichen Konzentration eine Hemmung der Insulinfreisetzung auf etwa 20% (in Gegenwart von 16,5 mM Glucose) beobachtete.

Diese Ergebnisse können folgendermaßen interpretiert werden: einerseits könnte man argumentieren, daß die Insulinsekretion - gleich ob Metabolit- oder Receptorvermittelt - ein ATPabhängiger Prozess ist, der bei einer Blockade der ATP-Synthese zum Erliegen kommt. So haben auch Ashcroft et al. (1973) einen schnellen Abfall des ATP-Spiegels in Inseln (innerhalb von 5 Minuten) nach Zusatz von Atmungskettenhemmstoffen beschrieben. Die Hemmung der Glucoseoxidation kann dann damit erklärt werden, daß der Citratcyclus durch die sich anstauenden Reduktionsäquivalente gehemmt wird. Unter diesen Bedingungen müßten Inseln vermehrt Lactat abgeben, was in der Tat schon von Hellerström und Gunnarsson (1970) nachgewiesen worden war.

Andrerseits könnte man auch fordern, daß die Insulinabgabe nicht ATPabhängig ist, sondern daß ein Metabolit bei der Oxidation des Kohlenstoffskeletts von Glucose im Citratcyclus gebildet werden muß, der die Insulinsekretion auslöst und der in Gegenwart von Cyanid nicht mehr gebildet werden kann. Es ist natürlich nicht auszuschließen, daß ATP der gesuchte Signalstoff ist, der bei der Hemmung der Sauerstoffaktivierung durch Cyanid zwar in der anaeroben Glykolyse noch gebildet wird, aber in sehr viel geringeren Ausbeuten, die für den sekretorischen Vorgang nicht mehr ausreichen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Ergebnisse der Untersuchungen mit Stoffwechsellinhibitoren nur schwer zu beurteilen sind. So ist z.B. die Spezifität eines Hemmstoffes in einem großen Zellverband nie gewährleistet, wie aus den Studien mit Jodacetat zu erkennen war. Außerdem müssen bei diesen Untersuchungen gleichzeitig Metabolitspiegel und Zeitabhängigkeiten bestimmt werden.

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß wir die Wirkung dieser Inhibitoren auch in Gegenwart von Theophyllin untersucht haben - das die Insulinsekretion unabhängig von der Glucoseoxidation stimuliert - , da bei einer Wirkung über einen Glucoreceptor die Potenzierung durch Theophyllin unbeeinflusst bleiben müßte. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig, sodaß sie nicht mit in diese Arbeit aufgenommen worden sind.

Abschließend wollen wir auch noch auf folgenden Aspekt hinweisen: geht man davon aus, daß die glucoseinduzierte Insulinsekretion durch die Erhöhung der Konzentration eines

Metaboliten vermittelt wird, so könnten Inhibitoren auch zu einer Förderung der Insulinsekretion führen: wird die Glykolyse auch in Inseln durch Jodacetat im Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- und durch Fluorid im Enolaseschritt gehemmt, so müßten sich die Substrate vor dem gehemmten Schritt anhäufen - wie es beschrieben worden ist - und wenn sie die Sekretion triggern (z.B. Fructose-1,6-Bisphosphat) zu einer Stimulierung der Insulinabgabe in den Extracellulärraum führen (siehe auch **nächsten** Abschnitt).

Metabolit- versus Receptorhypothese

Ausgehend von unseren experimentellen Befunden zur Bedeutung der Glucoseoxidation in Inseln für die glucoseinduzierte Insulinabgabe und den von anderen Untersuchern mitgeteilten **Ergebnissen** wollen wir in diesem Abschnitt die Frage Metabolit- oder Receptorvermittelte Insulinsekretion durch Glucose unter Berücksichtigung einiger noch nicht erwähnter Forschungen aus jüngster Zeit diskutieren.

Eine weitere Stütze hat die Metabolithypothese durch Arbeiten (Jain et al., 1975; Hahn et al., 1976) erfahren, nach denen D-Glycerinaldehyd - der von Inseln oxidiert wird (Ashcroft et al., 1973) - die Insulinsekretion stimuliert. Dabei findet sich eine ähnliche **sigmoidale** Dosis-Wirkungs-Beziehung wie bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion, nur daß die Schwellenkonzentration für die Insulinfreisetzung und die maximale Stimulierungskonzentration bei D-Glycerinaldehyd niedriger als bei D-Glucose liegen. Auch die Glycerinaldehydinduzierte Insulinsekretion ist durch Theophyllin potenzierbar. Aus den erwähnten Tracerstudien kann man folgern, daß Inseln entweder eine Triokinase besitzen, die Glycerinaldehyd in Glycerinaldehyd-3-Phosphat umwandelt, oder eine Alkoholdehydrogenase aufweisen, die den Aldehyd in Glycerin überführt, der anschließend zu 3-Phosphoglycerat phosphoryliert wird. Außerdem könnte Glycerinaldehyd dadurch in den Zellstoffwechsel eingeschleust werden, daß eine Aldehyddehydrogenase ihn zu Glycerat oxidiert, das anschließend zu 2-Phosphoglycerat phosphoryliert wird. Sollte ein Metabolit

für die glycerinaldehydinduzierte Insulinsekretion verantwortlich sein, so ist es aufgrund der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten des Aldehydes allerdings nur schwer zu sagen, welches Substrat dafür in Frage käme. Der Signalstoff dürfte aber in der 2. Phase der Glykolyse lokalisiert sein.

Andrerseits kann aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von D-Glycerinaldehyd mit D-Glucose auch nicht ausgeschlossen werden, daß diese Triose mit einem Glucoreceptor wirkt. Eine physiologische Bedeutung kommt der Sekretionsstimulierung durch Glycerinaldehyd auf keinen Fall zu, daß der Aldehyd in derartigen Konzentrationen nicht im Extracellulärraum auftritt.

Ein weiteres Pro-Argument der Metabolithypothese sind Studien mit Aldosereductasehemmstoffen wie Glutarsäurederivaten oder Colchicin, mit denen sich nach Gabbay und Tze (1972) die Umwandlung von Glucose in Sorbitol und gleichzeitig die Insulinsekretion hemmen läßt. Sorbitol entsteht durch Reduktion aus D-Glucose und kann bei Vorhandensein entsprechender Enzyme weiter in Fructose und Fructose-6-Phosphat überführt werden. Einer etwaigen Bedeutung dieses Sorbitolpathways für die glucoseinduzierte Insulinsekretion widerspricht Matschinsky mit einer Arbeit, in der er im Gegenteil eine Stimulierung der Insulinabgabe durch diese Hemmstoffe finden konnte (Fertel et al., 1972).

Eine Bestätigung haben die Arbeiten von Ashcroft et al. (1973) über die Veränderung von Metabolitspiegeln durch Berichte von Idahl (1973) erfahren, nach denen es bei ob/ob-Mäusen bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 3 auf 17 mM nach 20 bis 60 Sekunden zu einem Anstieg der Spiegel von Glucose-6-Phosphat (um 50%) und Fructose-1,6-Bisphosphat (um 35%) und nach 80 Sekunden zur Insulinabgabe kommt.

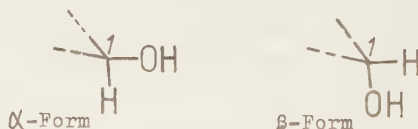
Aus ihren Versuchen mit gefasteten Versuchstieren leiten Levy et al. (1976) eine entscheidende Bedeutung des Glucosestoffwechsels für die Insulinsekretion ab: im Fastenzustand ist die Insulinsekretion auf Stimulierung mit Glucose reduziert, während die sekretorische Antwort auf einen Reiz z.B. mit Glycerinaldehyd oder Sulphonylharnstoffen unverändert bleibt.

Gleichzeitig sind die Glucoseoxidation und Lactatabgabe in isolierten Inseln herabgesetzt (von 25 auf 16 pMol Glucose/Insel/60 Minuten bei einem Glucoseangebot von 8, 7 mM bzw. von 120 auf etwa 60 pMol Lactat/Insel/ 60 Minuten in Gegenwart von 16,7 mM Glucose), während die Oxidation von D-Glycerinaldehyd keine Änderung erfährt (39 bzw. 38 pMol/Insel/ 60 Minuten bei einem Angebot von 10 mM). Die einfachste Erklärung dieser Beobachtungen wäre, daß Fasten eine Blockade der 1. Phase der Glykolyse verursacht. In Einklang mit dieser Annahme fanden Levy et al. eine Abnahme der Aktivität der Enzyme Glukokinase und Phosphofructokinase in Inseln und zogen daraus den Schluß, daß in der Glykolyse eine Schlüsselsubstanz für die Insulinsekretion gebildet wird.

Als Hinweise für die Existenz eines Receptors werden vor allem von Matschinsky folgende Argumente ins Feld geführt: obwohl 3-O-Methylglucose und Galactose die Lactatbildung aus 5,5 mM Glucose förderten und Fructose zu Kohlendioxid und Lactat abgebaut würde, sei keines dieser Substrate insulinsekretionsauslösend (Matschinsky et al., 1975; Pagliara et al., 1975). Außerdem bestünde eine mangelnde Korrelation von Metabolitspiegeln und sekretorischem Prozess, was von anderen Untersuchungen insofern bestätigt wird als daß sie keine Änderungen der Konzentrationen von Metaboliten des Citratcyclus (α -Ketoglutarat und Glutamat, Danielson et al., 1970; Citrat, Hellman und Idahl, 1972) fanden. Weiterhin sieht Matschinsky die Receptorhypothese dadurch gestützt, daß Jodacetamid in niedrigen Konzentrationen - die die Glykolyse blockieren, die permissive Funktion von Glucose bei der aminosäureinduzierten Insulinsekretion nicht stört.

Weiteren Auftrieb haben die Anhänger der Receptorhypothese durch Untersuchungen mit D-Glucoseanomeren erfahren. Die cyclische D-Glucose (Abb.I-1, S.1) kommt in zwei anomeren Formen vor, der α - und der β -D-Glucose (Abb.IV-2), die sich durch die Stellung der Hydroxylgruppe am C1-Atom unterscheiden.

Abb.IV-2 . Anomere
Formen der D-Glucose



In wässriger Lösung wird jedes Anomer - über die offenkettige Form - in ein Gleichgewichtsgemisch beider cyclischen Isomeren umgewandelt. Bei Inkubation von Inseln mit einem dieser beiden Anomeren wird dieses Gleichgewicht (64% α -Form, 36% β -Form) nach etwa 12 Minuten erreicht (Grill und Cerasi, 1975). Da β -D-Glucose an Mäuseinseln eine stärkere Glucose-6-Phosphatbildung und einen stärkeren Verdünnungseffekt auf die $^3\text{H}_2\text{O}$ -Bildung aus D(^3H)5-Glucose als das α -Anomer bewirkt, wurde geschlossen, daß Inseln bevorzugt β -D-Glucose verstoffwechseln (Idahl et al., 1975). Im Gegensatz dazu schützt α -D-Glucose die Inseln besser vor der toxischen Wirkung von Alloxan (Rossini et al., 1974) und führt am isoliert perfundierten Pankreas (Grodsky et al., 1974), an isoliert inkubierten Ratten- (Niki et al., 1974) und Mäuseinseln (Idahl et al., 1975) zu einer stärkeren Insulinfreisetzung. Diese Diskrepanz der Wirkungen der Glucoseanomere wird als Indiz dafür angesehen, daß der Glucoseeffekt über einen Membranreceptor vermittelt wird (Rossini und Soeldner, 1976).

Erwähnt werden müssen noch Versuche an Inseln, bei denen die glucoseinduzierte Insulinsekretion durch Behandlung mit Neuramidase aufhebbar war (Maier et al., 1973), und an partiell gereinigten Membranfragmenten von Inseln, bei denen Glucose, Mannose und Fructose die UV-Absorptionsspektren dieser Fragmente veränderten, während nicht stimulierende Zucker keine Wirkung zeigten (Price, 1973). Ob man daraus einen Hinweis für die Existenz eines Glucosereceptors ableiten kann, ist ungewiß.

Sollte die glucoseinduzierte Insulinsekretion über einen Membranreceptor vermittelt werden, so wäre dieser nur das Anfangsglied einer Reihe von auf die Besetzung des Receptors folgenden Ereignissen. Wichtig ist dabei vor allem die intracelluläre Übertragung der Information von der Membran auf das Granulasystem. Leider wissen wir noch zu wenig darüber, wie die Granula an die Plasmamembran gelangen - ob über eine einfache Brown'sche Molekularbewegung oder unter Vermittlung eines mikrotubulären-mikrofilamentären Systems - und ob ständig eine ausreichende Menge von Granula an der Plasmamembran bereit zur Fusion mit der Zellmembran liegt.

Im letzteren Fall könnte die Information zur Ingangsetzung der Meiose direkt von der Membran auf das Granulum übertragen werden. Würde jedoch durch die Stimulierung mit Glucose erst der Transport von Granula an die Plasmamembran beschleunigt, so wäre ein Überträgerstoff von der Membran zum Granulum bzw. mikrotubulären-mikrofilamentären System erforderlich. Dafür kämen Calcium und/oder cyclisches AMP in Frage. Ein derartiger, d.h. über einen Receptor vermittelter Prozess brächte den Vorteil, daß dadurch das Netzwerk des Intermediärstoffwechsels der Zelle unbeeinflußt bliebe.

Aus Studien an Bakterien wissen wir, daß extracellulär angebotene Glucose den intracellulären cycloAMP-Spiegel beeinflussen kann: bei Bakterien stimuliert das Disaccharid Lactose die Synthese der Enzyme seines Abbaues (Lac-Operon); die Zunahme der Enzymkonzentration ist längst nicht so ausgeprägt, wenn die Zellen außerdem mit Glucose oder anderen Kohlenhydraten wie Fructose oder Glucose-6-Phosphat als Kohlenstoffquelle wachsen. Dieser Effekt wurde interessanterweise - in Hinblick auf unser Thema - Katabolitrepession genannt, weil man anfangs annahm, daß intracelluläre Abbauprodukte (Katabolite) der Glucose die Synthese der Lac-Enzyme unterdrücken. Später konnte jedoch nachgewiesen werden, daß Glucose nur indirekt in diesen Vorgang eingreift: Glucose und einige andere Kohlenhydrate führen nämlich zu einer raschen Abnahme des intracellulären cycloAMP-Spiegels, wohingegen ein Abfall des Glucosespiegels im Kulturmedium einen Anstieg der cycloAMP-Konzentration in der Bakterienzelle bewirkt (Ullmann und Monod, 1968; Pastan und Perlman, 1970).

Über die Wirkung von Glucose auf das Adenylatcyclase/Phosphodiesterase-System in Langerhans'schen Inseln liegen dagegen bisher noch widersprüchliche Befunde vor. Nach älteren Arbeiten soll Glucose weder eine Stimulierung der Adenylatcyclase (Howell und Montague, 1973; Kuo et al., 1973) noch eine Hemmung der Phosphodiesterase (Bowen und Lazarus, 1973) und damit Steigerung des cycloAMP-Gehaltes in Inseln bewirken (Cooper et al., 1973). Dagegen beschrieben die Forschergruppen um Grodsky (Charles et al., 1973, 1975) und um Matschinsky (Zalawich et al., 1973, 1975) eine Erhöhung des cycloAMP-Gehaltes in Pankreasinseln nach Glucosegabe. Auch Cerasi hatte einen Anstieg des cycloAMP-Gehaltes nach Inkubation mit Glucose nachweisen können (Grill und Cerasi, 1973; Cerasi, 1975), wobei das α -Anomer stärker als das β -Anomer wirksam war (Grill

und Cerasi, 1975). Daß Änderungen des cyclo-AMP-Spiegels in jüngster Zeit nachgewiesen worden sind, ist mit Sicherheit auf die Entwicklung empfindlicherer Bestimmungsmethoden zurückzuführen.

Sollte cyclo-AMP an der glucoseinduzierten Insulinsekretion beteiligt sein, so könnte es z.B. durch Beeinflussung des transmembranären Calciumstromes oder über eine Aktivierung von Proteinkinasen zu einem vermehrten Transport von Granula an die Plasmamembran und nachfolgender Exocytose führen (S.8).

Sollte die glucoseinduzierte Insulinsekretion dagegen über einen Meta- bzw. Kataboliten vermittelt werden, so wäre folgendes zu bedenken: als Signal bezeichnet man die Einheit aus einem Träger, also z.B. einem Kohlenstoffskellett, und einer Struktur auf dem Träger, also einer oder mehrerer bestimmter funktioneller Gruppen. Das Signal wird erst dann zur Information, wenn es auf einen Empfänger trifft, der den Bedeutungsgehalt versteht. Der Empfänger wird höchstwahrscheinlich derselbe sein wie wenn - wie oben diskutiert - cycloAMP oder Calcium das Signal darstellen. In diesem Zusammenhang stoßen wir auf folgende Probleme: 1. die Glykolyse läuft im Cytosol, Citratcyclus und Atmungskette im Mitochondrium ab; die Granula befinden sich im Cytosol. Es erhebt sich damit die Frage, ob ein in Mitochondrien gebildeter Metabolit diese Zellorganelle ausreichend schnell verlassen könnte, um seiner Signalfunktion gerecht zu werden. Dabei ist auch die Größe des Moleküls von Bedeutung, da kleinere Moleküle - vor allem natürlich Erdalkali- und Alkalimetallionen - schneller als größere diffundieren. 2. Die Information stellt eine Zustandsgröße wie die Entropie dar. Da ein Informationsvorgang zu einer Zunahme der Ordnung (also Abnahme der Entropie) führt, ist er an den Verbrauch von Energie gebunden. Bei cycloAMP- und calciumvermittelten Prozessen ist der Energieverbrauch die Bildung von cycloAMP aus dem energiereichen ATP (das ja nicht regeneriert wird, da aus cycloAMP durch Hydrolyse 5'AMP entsteht) bzw. der ATPabhängige transmembranäre Transport von Calcium nach Erfüllung seiner Signalfunktion.

Wir halten es deshalb für unwahrscheinlich, daß z.B. Glucose-6-Phosphat den gesuchten Metaboliten darstellt, der nach Entstehung aus Glucose als Signal an den Empfänger diffundiert,

dort seine Signalfunktion erfüllt, anschließend "wieder in die Glykolysekette zurückkehrt" und weiter utlisiert wird. Dieser Schritt müßte dann zumindest mit der Hydrolyse zu Glucose verbunden sein, was einen Energieverbrauch für die Zelle bedeuten würde. 3. Die Konzentration eines Signalmetaboliten sollte außerordentlich fein regulierbar, da die ausgeschüttete Insulinmenge immer in einem bestimmten Verhältnis zur angebotenen Glucosemenge steht und da es für den Organismus wichtig ist, sich vor einer übermäßigen Insulinausschüttung (Gefahr der Hypoglykämie) zu schützen. Am besten ist eine derartige Regulation durch die Koordination zweier Enzyme zu erzielen, d.h. daß z.B. das Enzym, unter dessen Katalyse der Signalmetabolit entsteht, an einer Verzweigungsstelle des Stoffwechsels steht und daß das Enzym, das den Signalmetaboliten in den inaktiven Metaboliten Y überführt, eine niedrige Aktivität besitzt. Damit könnte für längere Zeit eine Erhöhung der Konzentration des Signalmetaboliten eintreten.

Nach unserer Auffassung sind diese Voraussetzungen nur in einem Nebenschritt der Glykolyse gegeben; dafür kämen der schon erwähnte Sorbitolpathway in Frage oder der nach unserem Wissen in Inseln noch nicht untersuchte 2,3-Diphosphoglycerat-cyclus, bei dem aus 1,3-Diphosphoglycerat durch eine Mutase-reaktion 2,3-Diphosphoglycerat entsteht. Dieses Molekül dient im Erythrocyten als Signal, das dem Hämoglobin Änderungen der Sauerstoff- und Protonenkonzentration im Blut meldet. Nach "Erfüllung seiner Signalfunktion" wird 2,3-Diphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat umgewandelt, das wieder ein Zwischenprodukt der 2.Stufe der Glykolyse darstellt. Entscheidend ist bei diesem Cyclus, daß mit der Abspaltung des Phosphatrestes von 2,3-Diphosphoglycerat - nicht wie bei der Umsetzung von 1,3-Diphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat - keine ATP-Bildung verbunden ist, weshalb die Bildung des Signalmetaboliten für den Erythrocyten ein energieverbrauchender Prozess ist (siehe oben).

Wäre ein derartiger Cyclus in Inseln aktiv, so könnte die Regulation der Konzentration des Signalstoffes durch passagere Umleitung des 1,3-Diphosphoglycerates erfolgen, ohne daß sich die Menge der Endprodukte wie Lactat oder CO_2 oder die Bildung von tritiiertem Wasser aus ^3H markierter Glucose verändert, da der Cyclus ja wieder in den Hauptweg mündet.

Obwohl die Frage nach dem Mechanismus, wie die 600 Millionen β -Zellen des Pankreas eine Erhöhung des Glucosespiegels erkennen und mit entsprechender Sekretion reagieren, nach wie vor offen ist, sprechen nach unserer Auffassung gewichtigere Gründe wie z.B. die Ergebnisse der Untersuchungen mit Glucose-anomeren oder mit SH-Reagentien für die Existenz eines Glucoreceptors.

Sollte dieser Receptor Teil eines membranären Adenylatcyclase-systems sein, so wäre allerdings noch zu klären, warum in unseren Versuchen cycloAMP nicht in Abwesenheit von Glucose wirkte. Dies deutet darauf hin, daß auch der Glucoreceptor nur Bestandteil eines komplexeren Receptorsystems wäre.

Daß sich die Konzentration einzelner Metabolite der Glykolysekette nach Glucosegabe ändert, ist kein zwingender Grund zur Annahme, daß sie bzw. einer der Metaboliten als Signal(e) wirken, denn auch an anderen Zellsystemen führt ein vermehrtes Substratangebot zu einer Veränderung der intracellulären Metabolitspiegel (wie z.B. einer Erhöhung der Konzentrationen der Zwischenprodukte des Harnstoffcyclus nach Perfusion einer Leber mit NH_4Cl).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß beide Hypothesen eine gemeinsame Berechtigung besitzen, da die Insulinsekretion in zwei Phasen abläuft (Grodsky, 1975), denen verschiedene Mechanismen zugrundeliegen könnten. Dieser biphasische Verlauf ist nur bei Bestimmung einer Zeitabhängigkeit erkennbar.

Die Synthese beider Hypothesen im dialektischen Sinne wäre dann eine Parallele zu dem Wissenschaftsstreit zwischen Otto Warburg und Heinrich Wieland Anfangs der Dreißiger Jahre über den Mechanismus der biologischen Oxidation, bei dem die beiden entgegengesetzten Vorstellungen durch die Entdeckung der Cytochrome zu einem gemeinsamen Konzept vereinigt werden konnten.

Erschwert ist der Fortschritt unseres Erkenntnisprozesses durch die experimentellen Hürden, die sich bei der Untersuchung des Inselsystems auftun. So müssen z.B. zur Untersuchung von Stoffwechselparametern viele Inseln in einem kleinen Volumen für längere Zeit inkubiert werden (um überhaupt eine ausreichende Empfindlichkeit zu erreichen), dagegen werden bei Sekretionsstudien wenig Inseln in einem größeren Volumen für kürzere Zeit eingesetzt, woraus die Frage folgt, ob man die Ergebnisse beider Versuche ohne weiteres miteinander vergleichen darf.

Daneben können auch Lebensalter, Ernährungszustand des Ver-

suchstieres sowie experimentelle Parameter (wie Frequenz des Inkubationsschüttlers, pH-Wert und Osmolalität des Inkubationsmediums) einen nicht unerheblichen Einfluß z.B. auf die Insulinsekretionsrate ausüben (Lernmark, 1971; Hahn et al., 1970).

Der entscheidende experimentelle Durchbruch wird erst dann gelingen, wenn es unter vertretbarem Aufwand möglich wird, β - von α -Zellen zu trennen und in großen Mengen anzureichern. Denn bisher müssen die Interpretationen von Versuchsergebnissen auch deshalb eingeschränkt werden, weil Inseln nur zu 70 bis 85% aus β -Zellen bestehen.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Bedeutung die Oxidation von Glucose für die glucoseinduzierte Insulinsekretion besitzt, d.h. ob im Glucosestoffwechsel ein Signalmetabolit gebildet wird, der die Sekretion auslöst, oder ob die Sekretion über einen für Glucose spezifischen Membranreceptor vermittelt wird.

Dazu wurden durch Collagenasepräparation gewonnene Langerhans'sche Inseln mit verschiedenen Mengen (radioaktiv markierter) Glucose inkubiert und die Menge des von den Inseln secernierten Insulins und des im Inselstoffwechsel gebildeten Kohlendioxids gemessen. Da beide Prozesse, die Insulinsekretion und die CO_2 -Bildung, einen sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Bezug zur extracellulären Glucosekonzentration aufwiesen, deren steilster Verlauf zwischen 5 und 10 mM - dem Bereich der physiologischen Schwankung des Blutzuckers - lag, wurde eine enge Verknüpfung zwischen den beiden Vorgängen vermutet.

Die zusätzliche Bestimmung der Glucoseaufnahme der Inseln zeigte, daß die Oxidationsrate bei steigendem Glucoseangebot relativ zur Glucoseutilisation abfällt.

Nach Untersuchungen mit C_1 - und C_6 -markierter Glucose ist dieser relative Abfall auf eine Reduktion der CO_2 -Bildung im Pentosephosphatweg bei steigendem Glucoseangebot zurückzuführen.

Um eine etwaige Bedeutung der Glucoseoxidation näher zu erforschen, wurde der Einfluß von Effektoren (Theopyllin, dbcycloAMP, Diazoxid und Glibenclamid) der Insulinsekretion auf die Glucoseoxidation studiert. Dabei zeigte sich, daß diese Effektoren zwar keinen Einfluß auf die Glucoseoxidation besitzen, aber nur in Gegenwart von Glucose die Insulinsekretion stimulieren.

Aus diesem Grunde wandten wir uns der Untersuchung der Wirkung von Glykolyseinhibitoren (Fluorid und Jodacetat) auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion und Glucoseoxidation zu. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus,

daß eine über einen Receptor für Glucose vermittelte Insulinsekretion durch eine Hemmung der Glykolyse weitgehend unbeeinflusst bleiben müßte. Tatsächlich fand sich bei einer Hemmung der Glucoseoxidation auf etwa 20% des Ausgangswertes eine Hemmung der Insulinsekretion auf nur 60%.

Diese Ergebnisse werden ausführlich unter Berücksichtigung der vorliegenden Literatur und unter Einbeziehung theoretisch-biochemischer Überlegungen diskutiert.

- Agren, A., Andersen, A., Hellerström, C.: Effects of D-Glyceraldehyde and D-Glucose on the insulin secretion of pancreatic islets isolated from the newborn rat. *FEBS Letters*, 71, 185 (1976)
- Aleyassine, H.: Energy requirements for insulin release from rat pancreas in vitro. *Endocrinology* 87, 84 (1970)
- Anderson, E., Long, J.A.: The effect of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. *Endocrinology* 40, 92 (1947)
- Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M., Randle, P.J.: Isolation of human pancreatic islets capable of releasing insulin and metabolising glucose in vitro. *Lancet* I, 888 (1971)
- Ashcroft, S.J.H., Hedekov, C.J., Randle, P.J.: Glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Biochem.J.* 118, 143 (1970)
- Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J.: Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem.J.* 119, 5 (1970)
- Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Täljedal, I.B.: Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets. *FEBS Letters* 20, 263 (1972a)
- Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M., Randle, P.J.: Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets. *Diabetes* 21, Suppl.2, 538 (1972b)
- Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Bassett, J.M., Randle, P.J.: The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets. *Biochem.J.* 126, 525 (1972c)
- Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Randle, P.J.: Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem.J.* 132, 223 (1973)
- Ashcroft, S.J.H., Capito, K., Hedekov, C.J.: Time course studies of glucose induced changes in glucose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate content of mouse and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 9, 299 (1973)

Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D.jr.: The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J.Clin.Invest.* 46, 1549 (1967)

Blobel, G., Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. *J.Cell Biol.* 67, 835 (1975)

Böttger, I., Löffler, G.: Die radioimmunologische Bestimmung von Insulin und Glukagon. In: *Handbuch der Inneren Medizin* (Hrsg.H.Schwiegk), Band 3, Pankreas, Springer-Verlag, Heidelberg 1976, p.368ff.

Bowen, V., Lazarus, N.R.: Glucose mediated insulin release: 3', 5' cAMP phosphodiesterase. *Diabetes* 22, 738 (1973)

Cerasi, E.: Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: some re-evaluations and proposals. *Diabetologia* 11, 1 (1975)

Coore, H.G., Randle, P.J.: Block of insulin secretion from the pancreas by D-mannoheptulose. *Nature* 197, 1264 (1963)

Coore, H.G., Randle, P.J.: Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem.J.* 93, 66 (1964)

Charles, M.A., Fanska, R., Schmidt, F.G., Forsham, P.H., Grodsky, G.M.: Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose induced insulin release. *Science* 179, 569 (1973)

Charles, M.A., Lawecki, J., Steiner, A.L., Grodsky, G.M.: Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3'5' monophosphate and calcium. *J.Biol.Chem.* 250, 6134 (1975)

Cooper, R.H., Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J.: Concentration of adenosine 3':5' cyclic monophosphate in mouse pancreatic islets measured by a protein binding radioassay. *Biochem.J.* 134, 599 (1973)

Danielson, A., Hellman, B., Idahl, L.A.: Levels of -ketoglutarate and glutamate in stimulated pancreatic B-cells. *Horm. Metab. Res.* 2, 28 (1970)

Effront, I.: *Bull.Soc.Chim.Paris* (3) 4, 337 (1890)

Fertel, R., Kotler-Brajtburg, J., Holowach-Thurston, J., Matschinsky, F.M.: Insulin secretion due to alpha-keto monocarbo-

xylic acids. Diabetes 21, Suppl.1, 359 (1972)

Findlay, J.A., Ashcroft, S.J.H.: Cells of the Islets of Langerhans. In: The Cell in Medical Science. Bd.3, Academic Press, London 1975, p.243ff.

Gabbay, K.H., Tze, W.J.: Inhibition of glucose-induced release of insulin by aldose reductase inhibitors. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 1435 (1972)

Georg, R.H., Sussman, K.W., Leitner, J.W., Kirsch, W.M.: Inhibition of glucose and tolbutamide induced insulin release by iodoacetate and antimycin A. Endocrinology 89, 169 (1971)

Gerich, J.E., Charles, M.A., Grodsky, G.M.: Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. Annu.Rev.Physiol.38, 353 (1976)

Grafe, E., Meythaler, F.: Beiträge zur Kenntnis der Regulation der Insulinproduktion. I.Mitteilung: Der Traubenzucker als Hormon für die Insulinabgabe. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharm. exp.Path. 125, 181 (1927)

Grafe, E., Meythaler, F.: Beiträge zur Kenntnis der Regulation der Insulinproduktion. II.Mitteilung: Die Wirkung von Kohlenhydraten (außer Traubenzucker) auf die Insulinabgabe. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharm.exp.Path. 131, 80 (1928a)

Grafe, E., Meythaler, F.: Beiträge zur Kenntnis der Regulation der Insulinproduktion. III.Mitteilung: Die Wirkung von Anhydrokohlenhydraten, Zuckerderivaten und Zuckerspaltungsprodukten. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharm.exp.Path. 136, 360 (1928b)

Green, I.C., Taylor, K.W.: Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. J.Endocr. 54, 317 (1972)

Grill, V., Cerasi, E.: Activation by glucose of adenylcyclase in pancreatic islets of the rat. FEBS Letters 33, 311 (1973)

Grill, V., Cerasi, E.: Glucose induced cyclic AMP accumulation in rat islets of Langerhans: preferential effect of the alpha anomer. FEBS Letters 54, 80 (1975)

Grodsky, G.M., Bennett, L.L.: Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. Diabetes 15, 910 (1966)

Grodsky, G.M., Batts, A., Bennett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B., Smith, D.F.: Effects of carbohydrate on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Amer.J.Physiol.* 205, 638 (1963)

Grodsky, G.M.: Insulin and the pancreas. *Vitamines Hormones.* 28, 37 (1970)

Grodsky, G.M., Fanska, R., West, L., Manning, M.: Anomeric specificity of glucose stimulated insulin release: Evidence for a glucosereceptor. *Science* 186, 536 (1974)

Grodsky, G.M.: The kinetics of insulin release. *Handb.Exp.Pharm. Bd.XXXII/2 (Insulin II)*, 1 (1975)

Hahn, H.J., Lippmann, H.G., Schultz, D.: Verhalten der Langerhans'schen Inseln des Pankreas in vitro. Präparationstechnik und Methodenkritik. *Acta biol.med.germ.* 25, 421 (1970)

Hahn, H.J., Ziegler, M., Mohr, E.: Inhibition of glucagon secretion by glucose and glyceraldehyde on isolated islets of wistar rats. *FEBS Letters* 72, 100 (1976)

Hellman, B., Hellerström, C.: Histology and histophysiology of the islets of Langerhans in man. In: *Handbuch des Diabetes mellitus*, Bd.I (Hrsg.E.F.Pfeiffer), Lehmann-Verlag, München 1969, p.89

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.: Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected pancreatic islets. *Biochem.J.* 123, 513 (1971)

Hellman, B., Idahl, L.A.: Pancreatic islets levels of citrate under conditions of stimulated and inhibited insulin release. *Diabetes* 21, 99 (1972)

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.: Iodoacetamide induced sensitization of the pancreatic β -cells to glucose stimulation. *Biochem.J.* 132, 775 (1973)

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.: in *Diabetes* (Hrsg.Malaisse, W.J., Pirart, J.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1974 p.65ff.

Hellman, B., Täljedal, I.B.: Effects of sulfonylurea derivatives on pancreatic β -cells. *Handb.Exp.Pharm.Bd.XXXII/2 (Insulin II)*, 175 (1975)

Hedeskov, C.J., Hertz, L., Nissen, C.: The effect of mannoheptulose on glucose and pyruvate stimulated oxygen uptake in normal mouse pancreatic islets. *Biochim.biophys.Acta* 261, 388 (1972)

Hellerström, C.: A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta endocr.(Kobenh.)* 45, 122 (1964)

Hellerström, C.: Effects of carbohydrates on the oxygen consumption of isolated pancreatic islets of mice. *Endocrinology* 81, 105 (1967)

Hellerström, C., Gunnarsson, R.: Oxygen utilization and oxidative metabolism in the B-cells. In: *On the pathogenesis of diabetes mellitus* (Hrsg.Luft,R., Randle, P.J.), Casa Editrice Il Ponte, Mailand, 1970, p.127ff.

Hellerström, C., Brolin, S.E.: Biochemistry and biophysics of insulin secretion. Energy metabolism of the B-cell. *Handb. Exp.Pharm.* XXXII (Insulin II), 57 (1975)

Hepp, K.D.: persönliche Mitteilung

Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W., Bleicher, S.: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J.clin.Endocr.* 25, 1375 (1965)

Hilwig, I., Schuster, S., Heptner, E., Wasielewski, E.: Über das Wachstum der Pankreaszellen von Säugetieren als monolayer cultures.I.Züchtungsmethode, Morphologie und Insulingehalt. *Z.Zellforsch.* 90, 333 (1968)

Hilwig, I., Schuster, S.: Über das Wachstum der Pankreaszellen von Säugetieren als monolayer cultures.II. Bildung histotypischer Aggregate aus Suspensionen fetaler menschlicher Pankreaszellen. *Z.Zellforsch.* 103, 282 (1970)

Howell, S.L., Montague, W.: Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans. Effects of agents which alter insulin secretion. *Biochim.biophys.Acta* 320, 44 (1973)

Idahl, L.A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.: Metabolic and insulin releasing activities of D-Glucose anomers. *Nature* 254, 75 (1975)

Idahl, L.A.: Glucose 6 phosphate content in mammalian β -cells. *Hormones* 2, 371 (1971)

Idahl, L.A.: Dynamics of pancreatic β -cell responses to glucose. *Diabetologia* 9, 403 (1973)

- Jain, K., Logothetopoulos, J., Zucker, P.: The effect of D- and L-glyceraldehyde on glucose oxidation, insulin secretion and insulin biosynthesis by pancreatic islets of rats. *Biochim. biophys. Acta* 399, 384 (1975)
- Jarrett, R.J., Keen, H.: Oxidation of sugars other than glucose by isolated mammalian islets of Langerhans. *Lancet* I, 633 (1966)
- Jarrett, R.J., Keen, H.: Glucose metabolims of isolated mammalian islets of Langerhans. *Metabolism* 17, 155 (1968)
- Keen, H., Sells, R., Jarrett, R.J.: A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results. *Diabetologia* 1, 28 (1965)
- Keane, P.M., Pearson, J., Walker, W.H.C.: Dextran coated charcoal immunoassay of insulin. *Diabetologia* 4, 339 (1968)
- Kissane, J.M., Robbins, S.E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J.Biol.Chem.* 233, 184 (1958)
- Kostianowski, M.K., Lacy, P.E.: A method for the isolation of intact islets of Langerhans from mammalian pancreas. *Fed.Proc.* 25, 337 (1966)
- Krebs, H., Henseleit, H.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chemie* 210, 33 (1932)
- Kuo, W.N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F.: Regulation by various hormones and agents of adenosine 3', 5' monophosphate levels in islets of Langerhans of rats. *Biochem.Pharmacol.* 23, 1387 (1974)
- Landau, B.: Quantitation of pathways of carbohydrate metabolism. In: *Handbook of Physiology. Section 7. Endocrinology Bd.1*, American Physiological Society, Washington 1972, p.215ff.
- Lacy, P.E., Kostianowski, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16, 35 (1967)
- Lambert, A.E.: The regulation of insulin secretion. *Rev.Physiol. Biochem.Pharmacol.* 75, 97 (1976)
- Lernmark, A.: Isolated mouse islets as a model for studying insulin release. *Acta diabet. Lat.* 8, 649 (1971)
- Lohmann, K., Meyerhof, O.: Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. *Biochem.Ztschr.* 273, 60 (1934)

Levy, J., Herchulez, A., Sener, A., Malaisse, W.J.: The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. XX. Fasting: a model for altered glucose recognition by the β -cell. *Metabolism* 25, 583 (1976)

Löffler, G.: unveröffentlicht

Löffler, G., Trautschold, I., Schweizer, T., Lohmann, E.: Zur Wirkung von HB 419 und Tolbutamid an isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte. *Arzneimittel-Forschung* 19, 1469 (1969)

Löffler, G., Petrides, P., Theiss, U.: Zur Stimulierung der Insulinsekretion durch Glukose. Deutsche Diabetes Gesellschaft. 7.Kongress. Bad Nauheim, Novo Documentation Service, Copenhagen, 1972, p.94ff.; *Acta Diabetol.Lat.* 10, 144 (1973)

Löffler, G., Weiss, L.: Die Stoffwechselwirkungen des Insulins. In: *Handbuch der Inneren Medizin* (Hrsg. H. Schwiegk), Band 7, Teil 2 A, Springer-Verlag, Heidelberg, 1975, p.249ff.

Löffler, G., Weiss, L.: Radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Serum. In: *Methoden der Hormonbestimmung* (Hrsg. Breuer, H., Hamel, D., Krüskemper, H.L.). Thieme-Verlag, Stuttgart, 1975, p.75ff.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurements with the Folin reagents. *J.Biol.Chem.* 193, 265 (1951)

Maier, V., Schatz, H., Pfeiffer, E.F.: Hinweise für einen Glukoserezeptor in isolierten Langerhans'schen Inseln der Maus. *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chemie* 356, 887 (1975)

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Wright, P.H.: A new method for the measurement in vitro of pancreatic insulin secretion. *Endocrinology* 80, 99 (1967)

Malaisse, W.J.: Etude de la sécrétion insulinaire in vitro. *Arcia*, Brüssel, 1969

Malaisse, W.J., Mahy, M., Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F.: The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas. *Europ.J.clin. Invest.* 2, 85 (1972)

Malaisse, W.J.: Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia* 9, 167 (1973)

Malaisse, W.J.: Biochemistry and biophysics of insulin secretion: Role of cations. *Handb.Exp.Pharm.* XXXII (Insulin II), 145 (1975)

Matschinsky, F.M., Ellerman, J.: metabolism of Glucose in islets of Langerhans. J.Biol.Chem. 243, 2730 (1968)

Matschinsky, F.M., Ellerman, J., Krzanowski, J., Kotler-Brajtburg, J., Landgraf, R., Fertel, R.: The dual function of glucose in islets of Langerhans. J.Biol.Chem. 246, 1007 (1971)

Matschinsky, F.M., Landgraf, R., Ellerman, J., Kotler-Brajtburg, J.: Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans. Diabetes 21, Suppl.2 (1972)

Matschinsky, F.M.: Enzymes, metabolites, and cofactors involved in intermediary metabolism of islets of Langerhans. In: Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology, American Physiological Society, Washington 1972, p.199ff.

Matschinsky, F.M., Ellerman, J.: Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans. Biochem.biophys.Res.Comm. 50, 193 (1973)

Matschinsky, F.M., Pagliara, A.S., Hover, B.A., Haymond, M.W., Stillings, S.N.: Differential effects of alpha- and beta-D - glucose on insulin and glucagon secretion from the isolated perfused pancreas. Diabetes 24, 369 (1975)

Matschinsky, F.M., Ellerman, J., Stillings, S., Rabaud, F., Pace, C., Zawulich, W.: Biochemistry and biophysics of insulin secretion: Hexoses and insulin secretion. Handb.Exp.Pharm. XXXII (Insulin II), 79 (1975)

Meyerhof, O., Schulz, W.: Eine neue Bestimmungsmethode der Phosphoglycerinsäure. Biochem.Ztschr. 297, 60 (1938)

Meyerhof, O.: Über umkehrbare Reaktionen der biolog.Zuckerspaltung Naturwissenschaften 23, 490 (1935)

Molnar, G.D., Taylor, W.F., Langworthy, A.L.: Plasma immunoreactive patterns in insulin treated diabetics. Studies during continous blood glucose monitoring. Mayo Clin.Proc. 47, 709 (1972)

Montague, W., Taylor, K.W.: Insulin secretion and the intracellular concentrations of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate in isolated islets of Langerhans. Biochem.J. 109, 30P (1968)

- Moskalewski, S.: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen.comp.Endocr.* 5, 342 (1965)
- Nielsson, R.: *Arkiv för Kemi usw. Schwed.Akademie der Wiss.* 10, 1 (1930)
- Niki, A., Niki, H., Miwa, I., Okuda, J.: Insulin secretion by anomers of D-glucose. *Science* 186, 150 (1974)
- Norfleet, W.T., Haymond, M.W., Pagliara, A.S., Matschinsky, F.M.: Collagenase induced modification of α - and β -cell secretory responses. 57th annual meeting of the endocrine society USA, New York 1975, Abstract Nr.73
- Pastan, I., Perlman, R.: Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* 169, 339 (1970)
- Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M.: Iodoacetate and iodoacetamide induced alterations of pancreatic α - and β -cell responses. *Endocrinology* 97, 698 (1975)
- Pipeleers, D.G., Malaisse, W.J.: The possible role of a glycolytic metabolite as a signal for glucose induced biosynthesis and release. *Diabetologia* 9, 86 (1973)
- Poznanski, N., Poznanski, W.J.: Laboratory application of the dextran coated charcoal radioimmunoassay of insulin. *Clin.Chem.* 15, 908 (1969)
- Price, S.: Pancreatic islet cell membranes: Extraction of a possible glucoreceptor. *Biochim.biophys.Acta* 318, 459 (1973)
- Randle, P.J.: Islet metabolism and insulin secretion. *Proc. of the 7th congress of the Int.Diabetes Federation. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1971*, p.232ff.
- Reese, A.C., Landau, B.R., Craig, J.W., Gin, G., Rodman, H.M.: Glucose metabolism by rat pancreatic islets in vitro. *Metabolism* 22, 467 (1973)
- Rossini, A.A., Soeldner, J.S.: Insulin release is anomeric specific in the human. *J.clin.Invest.* 57, 1083 (1976)
- Rossini, A.A., Berger, M., Shadden, J., Cahill, G.F.: Beta cell protection to alloxan necrosis by anomers of D-Glucose. *Science* 183, 424 (1974)
- Sams, D.J., Montague, W.: The role of 3'5'cyclic AMP in the regulation of insulin release. Properties of islet cell adeno-

sine 3':5' cyclic AMP phosphodiesterase. *Biochem.J.* 129, 945 (1972)

Schatz, H., Maier, V., Hinz, M., Nierle, C., Pfeiffer, E.F.: Stimulation of ^3H -Leucine incorporation into the proinsulin and insulin fraction of isolated pancreatic mouse islets in the presence of glucagon, theophylline and cyclic AMP. *Diabetes* 22, 433 (1973)

Seel, F.: *Grundlagen der analytischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1965

Snyder, P., Kashket, S., O'Sullivan, J.B.: Pentose cycle in isolated islets during glucose stimulated insulin release. *Amer.J.Physiol.* 219, 876 (1970)

Spiro, R.G.: Search for a biochemical basis of diabetic micro-angiopathy. *Diabetes* 12, 1 (1976)

Steiner, D.F., Kemmler, W., Tager, H.S., Peterson, J.D.: Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins. *Fed.Proc.* 33, 2105 (1974)

Steiner, D.F.: Errors in insulin biosynthesis. *New Engl.J.Med.* 294, 952 (1976)

Sussman, K.E., Vaughan, G.D.: Insulin release after ACTH, glucagon, and adenosine 3'-5'-phosphate (cyclic AMP) in the perfused isolated rat pancreas. *Diabetes* 16, 449 (1967)

Trautschold, I., Löffler, G., Ahrendt, Ch.: Enzymaktivitäten des Glukosestoffwechsels in isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte. *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.* 349, 1263 (1968)

Trautschold, I., Lohmann, E., Domor, H., Löffler, G.: Abstract 7th Congress Int.Clin.Chem. Genf, Sept.8-13, 1969

Turtle, I.R., Kipnis, D.M.: An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic-3'5'-adenosine monophosphate synthesis in tissues. *Biochim.biophys.Res. Comm.* 28, 797 (1967)

Turtle, I.R., Littleton, G.K., Kipnis, D.M.: Stimulation of insulin secretion by theophylline. *Nature* 213, 727 (1967)

Ullmann, A., Monod, J.: Cyclic AMP as an antagonist of catabolic repression in *E.coli*. *FEBs Letters* 2, 57 (1968)

Vance, J.E., Buchanan, K.D., Challoner, D.R., Williams, R.H.: Effect of glucose concentration on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetes* 17, 187 (1968)

- Warburg, O., Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem.Ztschr. 310, 384 (1942)
- Wood, H.G., Katz, J., Landau, B.R.: Estimation of pathways of carbohydrate metabolism. Biochem.Ztschr. 338, 809 (1963)
- Zalawich, W.S., Karl, R.C., Ferrendell, J., Matschinsky, F.M.: Effects of glucose, Ca^{++} and an ionophore on cyclic-3'5'-AMP and insulin release in isolated pancreatic islets. Diabetes 23, Suppl.1, 337 (1974)
- Zalawich, W.S., Karl, R.C., Ferrendell, J., Matschinsky, F.M.: Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5'AMP levels in pancreatic islets. Diabetologia 11, 231 (1975)

VII. D a n k s a g u n g e n

Herrn Prof.Dr.O.H.Wieland danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit, für die stete Förderung meiner wissenschaftlichen Interessen und für die freundliche Übernahme des Votum informativum.

Herrn Prof.G.Löffler, Leiter der Abteilung Biochemie der Forschergruppe Diabetes von 1969 bis 1975, heute Fachbereich Vorklinische Medizin der Universität Regensburg, danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Bearbeitung desselben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danke ich für ein vom Frühjahr 1971 bis Frühjahr 1973 gewährtes Stipendium, der Ludwig-Maximilians-Universität, München, für eine Reisebeihilfe.

Lebenslauf

Petro Epaminondas Petrides

wurde am 24.6.1949 als Sohn des Arztes Dr.med.Anton Sokrates Petrides und seiner Ehefrau Ingeborg in Berlin geboren. Nach dem vierjährigen Besuch der Volksschule trat er 1959 in das humanistische Gymnasium "Evangelisches Gymnasium zum Grauen Kloster" ein, das er 1968 mit dem Zeugnis der Hochschulreife verließ.

Im Sommersemester 1968 nahm er an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau das Studium der Medizin auf und wechselte nach der Ärztlichen Vorprüfung im Jahre 1970 an die Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Sommer 1969 war er mehrere Monate Gast an der Medical School des Guy's Hospital London gewesen.

In München arbeitete er von 1971 bis 1973 als Doktorand in der biochemischen Abteilung (Leiter: Prof.G.Löffler) der von den Professoren Dr.O.H.Wieland und Dr.H.Mehnert geleiteten Forschergruppe Diabetes. In dieser Zeit begann er gemeinsam mit H.A.Harper, G.Löffler und L.Weiss die Arbeit an einem Lehrbuch der Physiologischen Chemie, dessen 1. Auflage 1975 erschienen ist.

Nach Abschluß des Medizinstudiums mit der Ärztlichen Prüfung nahm er im Wintersemester 1975/76 das Studium der Chemie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn auf und wechselte noch im Verlauf dieses Semesters an die Universität München.

Zwischenzeitlich absolvierte er zusätzlich das amerikanische Examen für ausländische Ärzte (EFCMG).

In den Semesterferien war er als Medizinalassistent bisher an der Inneren und Pädiatrischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing und an der Dermatologischen Klinik der Universität München tätig.





